

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Etablierung eines Immunhyperthyreosemodells an
der Maus zur Behandlung von Morbus Basedow**

von Julia Anuschka Faßbender
aus Bergisch Gladbach

München 2015

**Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Lehrstuhl für Tieranatomie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von PD Dr. med. vet. Sven Reese

Angefertigt in der advanceCOR GmbH

Prof. Dr. med. Martin Ungerer

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Sven Reese
Korreferent/en:	Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Tag der Promotion: 31. Januar 2015

Meiner Familie

...und den Mäusen dieser Studie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Morbus Basedow beim Menschen	2
1.1	Ätiologie.....	2
1.2	Pathogenese	3
1.2.1	Struktur des TSH-Rezeptors.....	4
1.3	Klinik und Morphologie.....	6
1.4	Therapie und Prognose.....	7
2.	Morbus Basedow beim Tier	8
2.1	Spontan auftretende autoimmune Hyperthyreose	8
2.2	Induzierte autoimmune Hyperthyreose	9
2.2.1	Tiermodelle	9
2.2.1.1	Immunisierung mit Fibroblasten	10
2.2.1.2	Immunisierung mit TSHR cDNA	10
2.2.1.3	Immunisierung mit Adenoviren	11
2.2.1.4	Immunisierung mit CHO-Zellen	13
2.2.1.5	Splenozytentransfer und T-Zell-Depletion.....	14
2.2.1.6	Tiermodelle zur Induktion der endokrinen Orbitopathie	14
2.2.1.7	Empfängliche Mausstämme	15
2.2.2	Anatomie und Histologie der Schilddrüse der Maus	16
2.2.3	Physiologische Herzfrequenz der Maus.....	18
III.	MATERIAL UND METHODEN	20
1.	Versuchstiere	20
2.	Zeitschema	20
3.	Eingriffe am Tier	21
3.1	Immunisierung	21
3.1.1	Adenovirus	22
3.2	Bestimmung der Herzfrequenz.....	22
3.3	Blutentnahmen	24

3.3.1	Bestimmung der TSHR-Antikörper und der cAMP-Aktivität	25
3.3.2	Bestimmung von T ₄	26
3.4	Klinische Allgemeinuntersuchung	26
3.5	Histologische Untersuchung der Schilddrüsen	26
4.	Statistik.....	28
IV.	ERGEBNISSE	29
1.	Klinische Allgemeinuntersuchung	29
2.	Laborergebnisse	29
2.1	Anti-TSHR Antikörpertiter und cAMP Aktivität.....	29
2.2	T ₄ -Serumspiegel	32
3.	Effekt der Immunisierung auf die Herzfrequenz.....	34
4.	Histopathologische Ergebnisse.....	36
4.1	Auswirkung auf das Schilddrüsenvolumen.....	38
4.2	Auswirkung auf das Herzgewicht	39
5.	Effekt der Immunisierung auf das Körpergewicht.....	41
V.	DISKUSSION	43
1.	Material und Methoden	43
1.1	Wahl der Versuchstiere	43
1.2	Wahl des Protokolls	44
1.3	Wahl der Narkose.....	45
2.	Ergebnisse	45
2.1	Anti-TSHR-Antikörper	45
2.2	Thyroxin (T ₄ gesamt)	47
2.3	Histologie	48
2.4	Herzfrequenz	49
2.5	Körpergewicht	50
2.6	Einfluss des Virustiters.....	51
2.7	Andere mögliche Messparameter.....	52
2.8	Schlussbetrachtung.....	53
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	55
VII.	SUMMARY	57

VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	59
IX.	ANHANG	75
1.	Ergebnisse der TSHR-Antikörpermessungen	75
2.	Ergebnisse der Thyroxinmessungen.....	89
3.	Histopathologische Ergebnisse.....	95
4.	Herzfrequenz	101
5.	Körpergewicht	107
6.	Score Sheet	113
X.	TABELLENVERZEICHNIS	115
XI.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	116
XII.	DANKSAGUNG	117

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
μl	Mikroliter
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celcius
Abb.	Abbildung
Ad-GFP	Adenovirus, das GFP exprimiert
Ad-TSHR	Adenovirus, das den TSH-Rezeptor exprimiert
ALP	Alkalische Phosphatase
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
APC	Antigen presenting cell
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
bpm	Beats per minute
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl_2	Calciumchlorid
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Complementary DNA
CHO	Chinese Hamster Ovary
CK	Creatinkinase
cm	Zentimeter
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleic acid
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EO	Endokrine Orbitopathie
Fa.	Firma
FBS	Fetal Bovine Serum
g	Gramm/Zentrifugalbeschleunigung (Vielfaches der Erdbeschleunigung)
G	Gauge
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
IgG	Immunglobulin G
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
LDH	Laktatdehydrogenase
M.	Morbus
MgCl_2	Magnesiumchlorid
MgSO_4	Magnesiumsulfat
MHC	Major Histocompatibility Complex
mM	Millimolar
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
PBS	Phosphate Buffered Saline

PFA	Paraformaldehyd
pmol	Pikomol
P/S	Penicillin/Streptomycin
s.	siehe
SEM	Standard Error of the Mean
SD	Standard Deviation
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Thyroxin
TBAb	Thyroid blocking antibody
TBII	Thyrotropin-binding Inhibitory Immunglobulin
TPO	Thyreoperoxidase
TRAK	Thyreotropin-Rezeptor Antikörper
TSAb	Thyroid stimulating antibody
TSH	Thyreidea Stimulating Hormon
TSHR	TSH-Rezeptor
TSI	Thyreidea-stimulierende Immunglobuline
U/l	Units pro Liter
V. a.	Vor allem

I. EINLEITUNG

Morbus Basedow wurde im deutschen Raum erstmals 1840 von dem Dessauer Arzt Carl von Basedow beschrieben, der die klassischen Symptome der Erkrankung - Tachykardie, Exophthalmus und Struma – schilderte, die heute als Merseburger Trias bekannt sind. Annähernd zeitgleich (1835) berichtete sein irischer Kollege Robert James Graves von einem Zusammenhang zwischen Exophthalmus und einer Vergrößerung der Schilddrüse. Er ist Namensgeber der Erkrankung im englischsprachigen Raum (“Graves-Disease”).

Die Inzidenz für M. Basedow wird regional sehr unterschiedlich angegeben und reicht von 21 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr in Schweden (ABRAHAM-NORDLING et al., 2011) bis 50 Fälle pro 100.000 Einwohner in Großbritannien (VANDERPUMP et al., 1995). Frauen sind bis zu zehnmal häufiger betroffen als Männer (FELDKAMP, 2002).

Die Behandlung der autoimmunen Schilddrüsenüberfunktion erfolgt nach gegenwärtigem Stand symptomatisch durch Thyreostatika, Radiojodtherapie oder mittels chirurgischer Resektion als totale oder subtotale Thyreoidektomie (BAHN et al., 2011). Für die Entwicklung weiterer Therapieansätze sind Tiermodelle unerlässlich. In der Literatur sind bereits zahlreiche Modelle beschrieben, die verschiedene Mechanismen zur Auslösung der Krankheit bei der Maus darlegen. Für die Erforschung neuer Therapien sind Langzeitmodelle erforderlich, die das Aufrechterhalten der Erkrankung garantieren, sodass eine mögliche Genesung nicht auf eine Selbstlimitierung der Krankheit zurückzuführen ist. In der vorliegenden Studie soll ein Modell etabliert werden, das die Erhaltung der autoimmunen Hyperthyreose bei der Maus über mehrere Monate gewährleistet. Zudem soll der Nutzen verschiedener In-vivo-Parameter, Entwicklung des Körpergewichts und der Herzfrequenz im Hinblick auf den Verlauf der Erkrankung diskutiert werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Morbus Basedow beim Menschen

1.1 Ätiologie

Die Ätiologie des M. Basedow ist noch nicht vollständig geklärt, es wird jedoch von einem Zusammenspiel genetischer Faktoren und Umweltfaktoren ausgegangen (WEETMAN & MCGREGOR, 1994).

Erste Hinweise auf einen genetischen Hintergrund lieferte eine Zwillingsstudie aus Dänemark, die eine höhere Konkordanz für eineiige Zwillinge verglichen mit zweieiigen Zwillingen ergab (BRIX et al., 1998). Mittlerweile werden zahlreiche Genloci mit einer Empfänglichkeit für M. Basedow assoziiert. Die erste DNA-Sequenz, die in den Fokus des Interesses rückte, war die hochpolymorphe HLA-Region auf Chromosom 6, die bereits mit anderen Autoimmunerkrankungen, wie Typ I Diabetes und rheumatoider Arthritis, in Verbindung gebracht wurde. Hier wurden Polymorphismen an den HLA-Molekülen DR3 (MANGKLABRUKS et al., 1991) und DQA1*0501 (YANAGAWA et al., 1993) bei an M. Basedow erkrankten Europäern nachgewiesen.

Darüber hinaus wird ein Zusammenhang zwischen einer Punktmutation am CD40 Gen (TOMER et al., 2002) sowie am Protein Tyrosin Phosphatase-22 (PTPN22) Gen (VELAGA et al., 2004) und dem CTLA-4 Gen (YANAGAWA et al., 1995) und der Entstehung einer autoimmunen Hyperthyreose angenommen. Ein Polymorphismus am TSH-Rezeptor-Gen wurde als krankheitsspezifische Veränderung identifiziert (DECHAIRO et al., 2005). Bisher gibt es keine Datenlage, die eine Aussage darüber zulässt, ob schon ein einzelner Genpolymorphismus in der Lage ist, die Erkrankung zu begünstigen.

Bei den prädisponierenden Umweltfaktoren zeigte sich, dass Rauchen das Risiko, insbesondere für eine endokrine Orbitopathie deutlich erhöht (PRUMMEL & WIERSINGA, 1993). Eine Studie aus dem Jahr 2005 ergab darüber hinaus eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der gerauchten Zigaretten mit dem steigenden Risiko an M. Basedow zu erkranken (HOLM et al., 2005). Aber auch Stress (WINSA et al., 1991), übermäßige Jodversorgung (LAURBERG et al., 1991) und verschiedene Therapeutika können das Risiko erhöhen. Bei den

Therapeutika sind HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy), das zur HIV-Therapie eingesetzt wird (CHEN et al., 2005) und Interferon α als Auslöser bekannt. Interferone werden zur Behandlung viraler Infektionen, wie Hepatitis B oder C eingesetzt. Eine retrospektive Studie aus Australien ergab, dass diese Therapieform zwei verschiedene Arten der Thyreotoxikose auslösen kann, wovon eine Form dem M. Basedow gleicht (WONG et al., 2002).

Lange wurde von einem erhöhten Risiko durch den Infektionserreger *Yersinia enterocolitica* ausgegangen, der zu Kreuzreaktionen führen sollte (SHENKMAN & BOTTONE, 1976). Dieses Risiko wird allerdings mittlerweile als zu vernachlässigen eingestuft (KARASEK & LEWINSKI, 2003).

1.2 Pathogenese

Adams und Purves beschrieben 1956 erstmals ein schilddrüsenaktivierendes Agens (ADAMS & PURVES, 1956), das 1964 als Antikörper identifiziert wurde (KRISS et al., 1964). Das Hauptantigen ist der TSH-Rezeptor. Untersuchungen haben ergeben, dass die Zielepitope v. a. auf der extrazellulär liegenden Untereinheit A des Rezeptors liegen (NAGAYAMA et al., 1994). Bei den Autoantikörpern handelt es sich um eine heterogene Gruppe mit unterschiedlicher Affinität zu verschiedenen Epitopen (ENDO et al., 1992). Überwiegend handelt es sich um schilddrüsenstimulierende Antikörper (TSAb), aber auch blockierende und neutrale Antikörper konnten nachgewiesen werden (VALENTE et al., 1982). Die Bindung eines stimulierenden Antikörpers an den TSH-Rezeptor führt zu einer erhöhten Produktion von cAMP, wodurch die Jodaufnahme in die Thyreozyten gesteigert wird und letztlich die vermehrte Bildung und Freisetzung von Thyroxin (T_4) und Trijodthyronin (T_3) resultiert.

Der Antikörperbildung durch B-Lymphozyten geht ein Verlust der Selbsttoleranz gegenüber Schilddrüsenantigenen voraus. In der Folge kommt es zur Präsentation dieser Antigene an T-Zellen in MHC-II-Molekülen Antigen präsentierender Zellen (APC), insbesondere Makrophagen und dendritische Zellen. Die Interaktion zwischen APC und T-Zellen führt über die Bildung costimulierender Moleküle (v. a. B7-Moleküle) zur Aktivierung der T-Zelle und zur Differenzierung der T-Helfer-Zellen (TH-Zellen). Beim M. Basedow wird von einer gemischten TH1, TH2 und TH17 Reaktion ausgegangen, bei der allerdings

die TH2-Zellen überwiegen (HÖRMANN, 2005). Auch bei der Entwicklung der endokrinen Orbitopathie wurde eine vermehrte Beteiligung von TH2-Zellen im Spätstadium der Erkrankung nachgewiesen (ANISZEWSKI et al., 2000). Die TH2-Zellen stimulieren über Freisetzung verschiedener Zytokine wie Interleukin 4 und Interleukin 5 die Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen und die Freisetzung von Antikörpern vom Typ IgG1 (MULLINS et al., 1995; HÖRMANN, 2005).

1.2.1 Struktur des TSH-Rezeptors

Der TSH-Rezeptor gehört zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (BIRNBAUMER et al., 1990). Er besteht aus sieben transmembranen und einer großen N-terminal lokalisierten extrazellulären Domäne, die wiederum aus sieben Leucin-reichen Wiederholungen (leucin-rich repeats) besteht. Insgesamt umfasst der Rezeptor 744 Aminosäuren (NAGAYAMA, 1994) und weist im unglykolisierten Zustand ein Molekulargewicht von 84 kDa auf (MISRAHI et al., 1990).

Posttranslational unterliegt der Rezeptor intramolekularer Spaltung, bei der ein 50 Aminosäuren großes C-Peptid ausgeschnitten wird und damit eine Trennung in transmembrane und extrazelluläre Domäne stattfindet, die über Disulfidbrücken verbunden bleiben. Die Ektodomäne (A-Domäne) stellt die Bindungsstelle für TSH dar (BUCKLAND et al., 1985). Auch stimulierende Antikörper wie der humane M22-Antikörper binden ausschließlich an die A-Domäne des Rezeptors, wenn auch die Bindungsstellen nicht vollständig identisch sind (s. Abbildung 2). Bei M22 handelt es sich um einen monoklonalen, sehr potenten Autoantikörper (SANDERS et al., 2003; SANDERS et al., 2004). Der nicht gespaltene Rezeptor hingegen ist das stärkste Immunogen für blockierende Antikörper (CHEN et al., 2003). Durch Bindung des Autoantikörpers bzw. TSH an die extrazelluläre Domäne wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst. Über Generierung des second messenger cAMP erfolgt die Synthese der Glykoproteine T₃ und T₄.

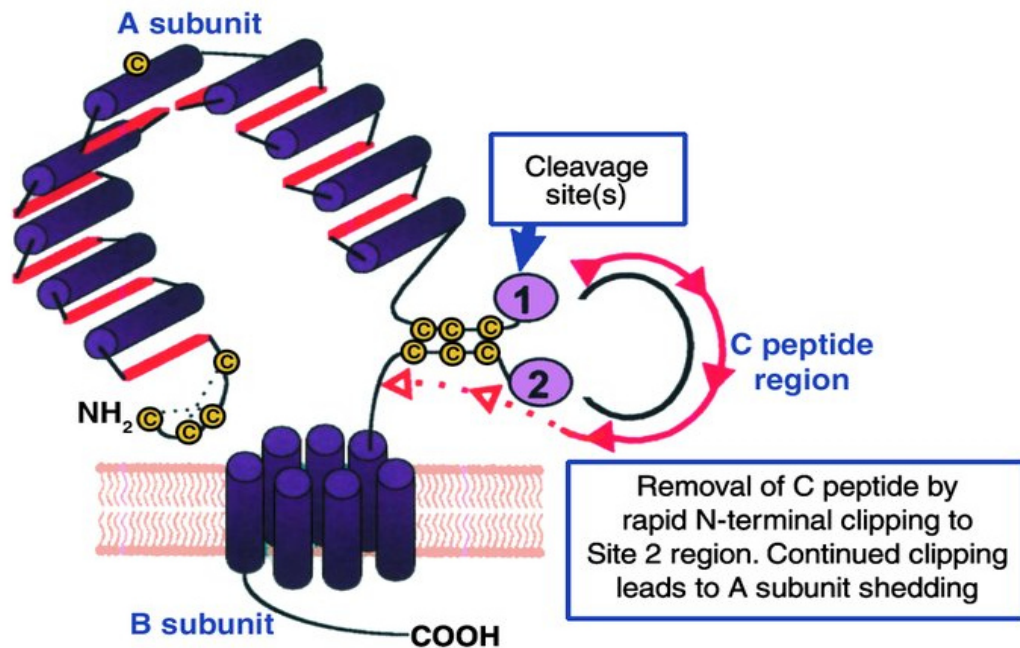


Abbildung 1: molekulare Struktur des TSH-Rezeptors nach Rapoport und McLachlan

(RAPOPORT & MCLACHLAN, 2001)

In erster Linie wird der TSHR in den Epithelzellen der Schilddrüse exprimiert. Darüber hinaus wurde er aber auch in zahlreichen extrathyroidalen Geweben nachgewiesen, unter anderem in Fibroblasten (HEUFELDER & BAHN, 1992), Adipozyten (JANSON et al., 1998), Kardiomyozyten (DRVOTA et al., 1995), Osteozyten (NOVACK, 2003), sowie in Neuronen und Astrozyten des Gehirns (CRISANTI et al., 2001), in der Niere (SELLITTI et al., 2000) und im Interstitium des Hodens (DAVIES et al., 1978). Klinische Relevanz hat diese Entdeckung besonders im Hinblick auf die Entwicklung einer endokrinen Orbitopathie oder eines prätibialen Myxödems. Die Zielzellen sind in diesem Fall die Fibroblasten der Orbita (GRUBECK-LOEBENSTEIN et al., 1994) bzw. in der Unterhaut (DAUMERIE et al., 2002).

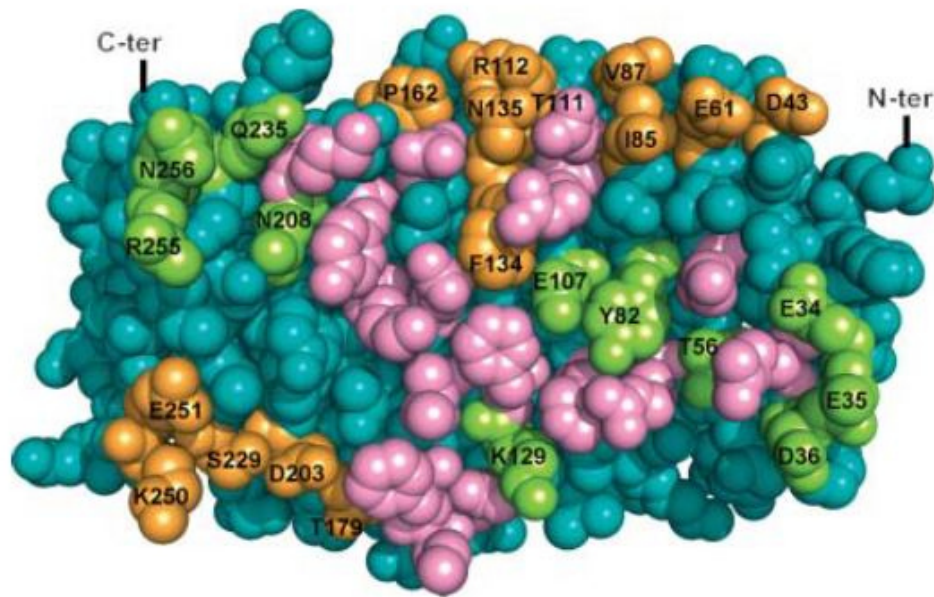


Abbildung 2: Bindungsstellen der A-Domäne nach Nunez Miguel

Grün dargestellt sind die Bindungsstellen, die nur mit M22 interagieren, orange sind die Bindungsstellen, die ausschließlich TSH binden und rosa die, die beide Liganden binden. (NUNEZ MIGUEL et al., 2009)

1.3 Klinik und Morphologie

Klinisch zeigen Patienten mit M. Basedow Symptome einer Hyperthyreose wie Gewichtsverlust, Nervosität oder vermehrtes Schwitzen.

Typisch ist die von Carl von Basedow beschriebene Merseburger Trias mit Struma, Exophthalmus und Tachykardie. Die Struma kann von einem Shuntgeräusch („schwirren“) begleitet sein. Eine Sinustachykardie ist die häufigste begleitende Herzrhythmusstörung bei einer Hyperthyreose. Bleibt diese über längere Zeit unbehandelt, können zudem Vorhofflimmern und kongestives Herzversagen auftreten (KLEIN & OJAMAA, 2001).

Hinzu kommt bei der autoimmunen Hyperthyreose eine verstärkte Beteiligung der Augen (endokrine Orbitopathie), die in der Regel beidseits auftritt. Diese äußert sich in Exophthalmus, einem retrobulbären Druckgefühl, vermehrte Tränenbildung und einer Schwellung des orbitalen Gewebes, die zu einer Kompression des Nervus opticus führen kann. In der Folge kommt es zu einer Verschlechterung der Sehleistung und zum Sehen von Doppelbildern. Eine EO tritt bei ungefähr 50 bis 70 % der Morbus Basedow Patienten auf (HEUFELDER & HOFBAUER, 2007).

Ein prätibiales Myxödem oder Akropachie können weitere, wenn auch seltene systemische Manifestationen darstellen. Ungefähr 4 – 5 % der Morbus Basedow-Patienten entwickeln ein prätibiales Myxödem (ANDERSON & MILLER, 2003). Die Inzidenz für eine Akropachie ist noch geringer und liegt bei unter 1 % (ANDERSON & MILLER, 2003). Beide Formen treten meist bei Patienten auf, die auch schon eine endokrine Orbitopathie entwickelt haben (FATOURECHI et al., 2003; FATOURECHI, 2005).

Im Serum sind T_4 und T_3 erhöht bei gleichzeitig niedrigen TSH-Werten. Pathognomonisch ist der Nachweis von Antikörpern gegen den TSHR. Zusätzlich sind bei 72 % der Patienten auch Antikörper gegen TPO (ALNAQDY & ALMASKARI, 2005) und bei rund 30 – 40 % gegen Thyroglobulin nachweisbar (SAPIN et al., 2003). Als Folge der Rezeptorstimulation durch stimulierende Antikörper ist cAMP erhöht.

Morphologisch fällt eine deutliche, bis zu vierfache Vergrößerung der Schilddrüse auf (GEBERT & THOMAS, 1996). Im Ultraschall stellt sich das Gewebe diffus echoarm dar. In der farbkodierten Duplexsonographie zeigt sich zudem eine starke Hypervaskularisation des Gewebes. Ralls beschrieb erstmals diese typische Farbkodierung bei Morbus Basedow-Patienten und bezeichnete sie als „thyroid inferno pattern“. Das Farbmuster besteht aus zahlreichen kleinen Herden, die sich über die gesamte Schilddrüse verteilen (RALLS et al., 1988). Das Ausmaß der Hypervaskularisation korreliert dabei nicht, wie zunächst angenommen, mit der Schilddrüsenfunktion, sondern mit dem Grad der Entzündung (CASTAGNONE et al., 1996).

Im histologischen Schnittbild sind neben der erwähnten Organvergrößerung und Hyperämie eine Hyperplasie und Hypertrophie des Parenchyms sowie Lymphozytenaggregate im Stroma typisch. Die Follikelepithelzellen sind von kubischer bis zylindrischer Gestalt und besitzen lumenseitig papilläre Ausläufer (SCHMID, 2013). Das Kolloid ist von Resorptionsvakuolen durchzogen (GEBERT & THOMAS, 1996).

1.4 Therapie und Prognose

Die *American Thyroid Association* and *American Association of Clinical Endocrinologists* benennen in ihren aktuellen Leitlinien drei mögliche

Therapieformen zur Behandlung des M. Basedow: die chirurgische Therapie in Form der totalen oder subtotalen Thyroidektomie, die medikamentöse Therapie mit Thyreostatika und die Radiojodtherapie, bei der dem Patienten radioaktives Jod ($I-131$) peroral oder intravenös verabreicht wird, das sich daraufhin in der Schilddrüse einlagert und diese durch gezielte Bestrahlung zerstört (BAHN et al., 2011). Präferenzen für die eine oder die andere Therapieform sind regional unterschiedlich. Während in den USA der Radiojodtherapie der Vorzug gegeben wird, wird in Europa und Asien eine thyreostatische und/oder eine chirurgische Therapie bevorzugt (WARTOFSKY et al., 1991).

Die Prognose wird unterschiedlich eingeschätzt. Ähnlich wie bei der Ätiologie spielen auch hier verschiedene Umweltfaktoren eine Rolle. Kaguelidou et al. beschrieben ethnische Herkunft, Alter und Schweregrad der Erkrankung als wichtige prognostische Merkmale. Demnach haben europäische Kinder eine höhere Wahrscheinlichkeit symptomfrei zu werden als afrikanische, asiatische oder karibische Kinder (KAGUELIDOU et al., 2008). Im Allgemeinen wird die Remissionsrate in Gebieten mit ausreichender Jodversorgung mit circa 40 bis 60 % (je nach Behandlungsdauer) bei erwachsenen Patienten angegeben, bei Kindern nur höchstens 30 % (ALLANNIC et al., 1990; GARCIA-MAYOR et al., 1992; LEGER et al., 2014; MOHLIN et al., 2014). Frauen, die nach einer medikamentösen Therapie bereits in Remission waren, haben während der Postpartum-Phase ein erhöhtes Risiko, an einem Rezidiv zu erkranken (ROTONDI et al., 2008).

2. Morbus Basedow beim Tier

2.1 Spontan auftretende autoimmune Hyperthyreose

Im Gegensatz zur autoimmunen Hypothyreose (Hashimoto Thyreoiditis), die bei Hühnern (WITEBSKY et al., 1969), Mäusen (BRALEY-MULLEN et al., 1999), Ratten (ALLEN et al., 1986), Hunden (GOSSELIN et al., 1980; HAINES et al., 1984) und Krallenaffen (LEVY et al., 1972) beschrieben wurde, ist bisher kein Fall von autoimmuner Hyperthyreose beim Tier bekannt. Bei Katzen, die eine ähnlich hohe Inzidenz für Hyperthyreose haben wie der Mensch, wurde zunächst eine autoimmune Ätiologie vermutet und mittels indirekter Immunfluoreszenz

konnten Autoantikörper nachgewiesen werden (KENNEDY & THODAY, 1988). Das diese Autoantikörper aber keine stimulierende Wirkung auf den TSHR haben und daher nicht mit dem Krankheitsbild des M. Basedow vergleichbar sind, zeigt hingegen eine Studie aus dem Jahr 2002 (NGUYEN et al., 2002).

Die Arbeitsgruppe McLachlan et al. vermutete ein spontanes Auftreten bei Menschenaffen aufgrund einer ähnlichen Struktur des TSH-Rezeptors. Aber auch umfangreiche Recherchen konnten diese Theorie nicht bestätigen. Die Autoren hielten fehlende genetische Polymorphismen als Ursache für möglich (MCLACHLAN et al., 2011).

Ein Fall von nicht kongenitaler Hyperthyreose bei einem Gorilla wurde aus dem Dresdner Zoo berichtet (SCHNEIDER, 1989). Die Ätiologie wurde nicht geklärt und das Tier rein symptomatisch behandelt. Da weder Serum noch Schilddrüsengewebe von diesem Tier asserviert wurden, war auch eine nachträgliche Diagnose nicht mehr möglich. Ein autoimmuner Hintergrund kann somit nicht restlos ausgeschlossen werden, ist aber auch nicht bewiesen.

2.2 Induzierte autoimmune Hyperthyreose

2.2.1 Tiermodelle

Das erste Tiermodell, das sich mit der Antikörperbildung gegen Schilddrüsengewebe befasste, stammt aus dem Jahr 1956. Die Autoren beimpften Kaninchen mit Schilddrüsenextrakt und beobachteten eine Antikörperbildung sowie histologische Veränderungen des Schilddrüsenorgans (ROSE & WITEBSKY, 1956). In den 1990er Jahren wurden zahlreicher Versuche unternommen, M. Basedow durch Xenotransplantation von thyroidealem Gewebe in Kombination mit Immunzelllinien bei der Maus auszulösen. Obwohl durchaus Erfolge mit diesen Verfahren zu verzeichnen waren, so waren sie doch mit großem Aufwand verbunden und abhängig von dem Vorhandensein von T-Zelllinien oder Knochenmarkzellen (MORITA et al., 1993; SOLIMAN et al., 1995; YOSHIKAWA et al., 1997). Neuere Modelle sind daher auf eine in vivo Expression des TSHR durch eine Stimulation des Immunsystems ausgerichtet. Die Verfahren sollen im Folgenden vorgestellt werden.

2.2.1.1 Immunisierung mit Fibroblasten

Erst 40 Jahre nach der Entdeckung von Rose und Witebsky wurde das erste Tiermodell, bei dem spezifische Antikörper gegen den TSH-Rezeptor in vivo exprimiert wurden, von Shimojo et al. entwickelt. Die Arbeitsgruppe immunisierte Mäuse vom Stamm AKR/N (H-2^k) mit murinen Fibroblasten, die den humanen TSH-Holorezeptor und ein MHC II Molekül exprimierten. Bei ca. 20 % der immunisierten Mäuse konnte nach sechs Immunisierungen im Abstand von je zwei Wochen sowohl stimulierende Antikörper gegen den TSH-Rezeptor, als auch erhöhte Hormonwerte und histologisch eine Hyperplasie festgestellt werden. Eine Kontrollgruppe wurde mit Fibroblasten immunisiert, die zwar den TSHR, aber nicht das MHC II Molekül exprimierten. Bei dieser Gruppe konnten keine Veränderung nachgewiesen werden. Als Ursache wurde die fehlende Antigenpräsentation an T-Lymphozyten angenommen und gefolgert, dass die Koexpression beider Moleküle essentiell für die Entwicklung einer autoimmunen Hyperthyreose ist (SHIMOJO et al., 1996). Diese Ergebnisse wurden von einer weiteren Arbeitsgruppe bestätigt, die bei identischem Protokoll außerdem blockierende Antikörper am TSHR nachwies (KITA et al., 1999).

2.2.1.2 Immunisierung mit TSHR cDNA

Der erste Bericht über ein Tiermodell, das über Plasmid-Injektion immunisierte, stammt von Costagliola et al. Die Arbeitsgruppe injizierte weiblichen BALB/c Mäusen einen DNA-Vektor, der für den humanen TSH-Rezeptor codiert. Die intramuskulären Injektionen wurden dreimal im Abstand von je drei Wochen durchgeführt. Acht und elf Wochen nach der ersten Immunisierung wurden Blutproben gewonnen. Nach acht Wochen waren bei allen Tieren hohe IgG-Titer messbar. In einem Teil der Proben waren TBAb- und TBII-Aktivität feststellbar, sowie bei einem Tier eine deutliche TSAb-Aktivität. Histologisch zeigten die vakzinierten Tiere eine lymphozytäre Infiltration der Schilddrüse (COSTAGLIOLA et al., 1998). Diese Ergebnisse konnten jedoch nicht zuverlässig reproduziert werden. In einer weiteren Studie konnte keine Thyreoiditis ausgelöst werden und die Antikörpertiter waren deutlich niedriger (PICHURIN et al., 2001).

2.2.1.3 Immunisierung mit Adenoviren

Nagayama et al. entwickelten 2002 das erste Immunisierungsprotokoll mit einem TSHR exprimierenden Adenovirus. Verschiedenen Mausstämmen wurde ein Adenovirus injiziert, das entweder den TSHR oder β -Galactosidase exprimierte. Die intramuskuläre Injektion wurde insgesamt dreimal im Abstand von je drei Wochen durchgeführt. Die Virusmenge betrug 1×10^{11} Partikel gelöst in 50 μ l PBS. Mit dieser neuen Methode wurden bei bestimmten Mausstämmen höhere Hyperthyreoseraten erzielt als mit früheren Protokollen. 53 % der weiblichen und 33 % männlichen Tiere vom Stamm BALB/c (H-2^d), sowie 25 % der weiblichen C57BL/6 (H-2^b) Mäuse zeigten erhöhte Serum T₄-Level. Tiere, die mit dem β -Galaktosidase exprimierenden Adenovirus immunisiert wurden, zeigten hingegen keine Auffälligkeiten. Positive TSI-Aktivität, also das Vorhandensein von stimulierenden Antikörpern, konnte mit einer Ausnahme bei allen Tieren mit erhöhten T₄-Werten gemessen werden, jedoch bei keinem euthyreoten Tier. Auch das histologische Bild entsprach dem des Morbus Basedow. Die Schilddrüsen waren diffus vergrößert aufgrund einer Hypertrophie und Hyperplasie der Follikel epithelzellen. Die Thyreozyten waren von flacher bis zylindrischer Gestalt mit Zellausläufern ins Follikellumen. Eine lymphozytäre Infiltration des Gewebes, wie sie bei Morbus Basedow auftritt, konnte allerdings nicht beobachtet werden. Zusätzlich wurde extraokulares Muskelgewebe histologisch untersucht, das jedoch keinen auffälligen Befund zeigte (NAGAYAMA et al., 2002).

Auf diesen Ergebnissen basierend entwickelten Chen et al. ein Modell, das die zentrale Rolle der Domäne A des TSHR belegen sollte. Die Arbeitsgruppe entwickelte Adenoviren, die lediglich die Domäne A des TSHR exprimieren (Ad-TSHR-289) beziehungsweise einen Rezeptor, der sich partiell in die Domänen A und B spaltet („Wildtyp“). Kontrolltiere wurden mit Virus immunisiert, das entweder den gesamten, nicht spaltenden Rezeptor (Ad-TSHR-D1NET) oder β -Galaktosidase exprimiert. Das Immunisierungsprotokoll entsprach dem der Nagayama-Studie. T₄ wurde eine Woche nach der zweiten Immunisierung sowie nach der finalen dritten Immunisierung bestimmt. Bereits bei der ersten Messung zeigten acht von zehn BALB/c Mäusen, die mit dem Untereinheit A-tragenden Virus geimpft wurden, erhöhte T₄-Spiegel im Serum. In der Wildtyp-Gruppe waren drei von zehn Tieren hyperthyroid und lediglich ein Tier von zehn in der Gruppe, die mit nicht-spaltendem TSHR immunisiert wurde. Bei der finalen

Messung sanken die T₄-Werte zwar ab, dennoch waren sechs von zehn Tieren der Untereinheit-A-Gruppe hyperthyroid. In der Wildtyp-Gruppe hatte nur noch ein Tier erhöhte T₄-Level und in der Gruppe, die mit nicht spaltendem TSHR beimpft wurde, waren alle Mäuse euthyroid. Erhöhte TSAb Werten waren insbesondere in der Untereinheit-A-Gruppe nachweisbar, in der mit Ad-TSHR-D1NET immunisierten Gruppe hingegen waren die TBAb erhöht. Mit Wildtyp-TSHR immunisierte Mäuse zeigten bei beiden Parametern intermediäre Werte. Der histologische Befund entsprach den Ergebnissen der T₄-Messung. Die Schilddrüsen der Ad-TSHR-189 Tiere waren aufgrund einer Hyperplasie diffus vergrößert. Im Gegensatz dazu zeigte die Kontrollgruppe keine Vergrößerung und die Wildtyp-Tiere lagen im Mittel. Zelluläre Infiltrationen oder knotige Veränderungen wurden bei keinem Tier gefunden (CHEN et al., 2003).

Das Modell wurde seither wiederholt modifiziert. Zum Beispiel mit zusätzlicher Vitamin D-Suppression, die jedoch keinen nennenswerten Effekt ergab (MISHARIN et al., 2009).

Kita-Furuyama et al. infizierten dendritische Zellen mit einem TSHR-exprimierenden Adenovirus, die anschließend sechs Wochen alten BALB/c Mäusen subkutan verabreicht wurden. Mit dieser Methode konnte bei 35 % der Tiere eine autoimmune Hyperthyreose in Form von erhöhten T₄-Leveln und der Bildung von TSHR-Antikörpern ausgelöst werden (KITA-FURUYAMA et al., 2003).

Eine Studie über die Langzeitwirkung der Immunisierung mit Untereinheit-A-Adenovirus zeigte, dass Antikörper auch noch 20 Wochen nach Beginn der Immunisierung nachweisbar sein können. Sowohl transgene Mäuse, die den humanen TSHR intrathyroidal exprimieren und daher eine Selbsttoleranz entwickelt haben, als auch Mäuse vom Wildtyp (BALB/c) wurden zwei- oder dreimal mit diesem Virus in der Konzentration von 10¹⁰ Partikeln pro Injektion behandelt. Blutproben wurden vier, zehn und 20 Wochen nach der ersten Immunisierung untersucht. Ermittelt wurden TBI- und TSAb-Aktivität und TSHR-Antikörper vom Typ IgG. Eine Messung des Gesamt-T₄ und eine histologische Untersuchung erfolgten zum Zeitpunkt der Euthanasie nach 20 Wochen. Der Großteil der dreimal immunisierten und auch ein Teil der zweimalig immunisierten Wildtyp-BALB/c Mäuse zeigte hohe TBI-Aktivität in allen drei Messungen. Wenige der transgenen Tiere erreichten positive TBI-Werte und kein

Tier zeigte nach 20 Wochen noch Aktivität. Sowohl bei den zweimal, als auch bei den dreimal immunisierten Wildtyp-Mäusen waren zudem in allen drei Untersuchungen Antikörper mittels ELISA nachweisbar. Die dreimal immunisierten Tiere erreichten jedoch höhere Titer. Vergleichsweise wenige transgene Tiere entwickelten Antikörper und diese in deutlich geringerer Menge. Bei einzelnen Tieren waren diese aber auch bis zur 20. Woche nachweisbar. TSAb-Aktivität war bei Wildtyp-Mäusen deutlich seltener vorhanden als TBI-Aktivität oder Antikörper. Ca. 50 % der Gruppe, unabhängig von der Anzahl der Immunisierungen, war positiv. Bei den transgenen Tieren war nach zwei Immunisierungen kaum TSAb-Aktivität messbar, nach drei Immunisierungen waren allerdings wenige Tiere bei allen drei Messungen positiv. Die finale T₄-Messung und die histologische Untersuchung erbrachte bei keinem Tier einen auffälligen Befund (MCLACHLAN et al., 2012b).

Nicht nur bei der Maus erwies sich das Adenovirusmodell als erfolgreich. Eine chinesische Arbeitsgruppe löste mit dreimaliger Adenovirusinjektion (A-Sub-Ad) erfolgreich eine Hyperthyreose bei Rhesusaffen aus. Neben hohen Antikörpertitern zeigte die Hälfte der Tiere erhöhte T₄-Spiegel und eine vergrößerte Schilddrüse. Auch die Herzfrequenz wurde bestimmt und es ergab sich ein Anstieg bei den immunisierten Tieren verglichen mit der Kontrollgruppe. Außerdem zeigten die hyperthyreoten Tiere einen Gewichtsverlust. Andere klinische Parameter wie Körpertemperatur, Blutdruck oder Blutchemie (ALT, AST, ALP, LDH und CK wurden mehrfach gemessen) zeigten in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (WANG et al., 2013).

2.2.1.4 Immunisierung mit CHO-Zellen

Einen neuen Ansatz stellte die Immunisierung mit TSHR exprimierenden CHO-Zellen dar. Weiblichen sechs bis acht Wochen alten chinesischen Hamstern wurden über zwölf Wochen CHO Zellen intraperitoneal injiziert. Die Injektionen wurden im Abstand von je zwei Wochen durchgeführt. Eine zweite Tiergruppe erhielt mit humanem Interferon γ stimulierte CHO-Zellen nach einem ähnlichen Protokoll. In der ersten Gruppe (n = 10) zeigte ein Tier klinische Erscheinungen einer Hyperthyreose wie Hyperaktivität, Nervosität und erhöhten Futter- bzw. Wasserbedarf. Der T₄-Spiegel war sowohl bei diesem Tier, als auch bei zwei

weiteren Hamstern erhöht. In vier Serumproben konnten stimulierende Antikörper nachgewiesen werden und vier Proben zeigten erhöhte cAMP-Level. Histologisch waren eine Hypertrophie der Follikelepithelzellen und eine fokale Lymphozyteninfiltration nachweisbar. Die Tiere der zweiten Gruppe (n = 9) entwickelten unter dem Immunisierungsprotokoll Nebenwirkungen in Form von erosiven Dermatitis ab der vierten Injektion, woran vier Tiere verstarben. Die Laboruntersuchungen ergaben physiologische T₄-Werte in der gesamten Gruppe und bei drei Proben einen Nachweis von stimulierenden Antikörpern. In drei Proben wurden blockierende Antikörper gemessen und die cAMP Werte waren signifikant erniedrigt. Histologisch zeigte sich bei diesen Tieren eine Atrophie und eine Reduktion des Kolloids. Veränderungen im retrobulbären Gewebe konnte bei keinem Tier der beiden Gruppen nachgewiesen werden. (ANDO et al., 2003).

2.2.1.5 Splenozytentransfer und T-Zell-Depletion

Ein wenig erfolgversprechender Ansatz stellte der Transfer von Splenozyten dar. In diesem Fall wurden Antikörpertiter gegen den murinen TSHR bei TSHR-knock-out-Mäusen mittels zweimaliger Adenovirus-Immunisierung erzeugt. Anschließend wurden Splenozyten der antikörperpositiven Tiere auf athymische Nacktmäuse übertragen. Zunächst waren vier Wochen nach dem Transfer bei 46 % der Tiere Antikörper gegen den endogenen TSHR nachweisbar, doch nur 21 % entwickelten eine Hyperthyreose (bestimmt über T₄ und TSH). 16 und 24 Wochen nach dem Transfer war bei keinem einzigen Tier mehr eine Hyperthyreose nachweisbar und 65 % wurden darüber hinaus sogar hypothyreot (NAKAHARA et al., 2012). Auch in einer anderen Studie führte die Depletion von T-Zellen wie hier bei den Nacktmäusen nicht zur Induktion von Morbus Basedow (MCLACHLAN et al., 2012a).

2.2.1.6 Tiermodelle zur Induktion der endokrinen Orbitopathie

Auch Tiermodelle, bei denen eine Augenbeteiligung im Vordergrund stand, wurden entwickelt. Die Modelle sollen im Folgenden nur kurz beschrieben werden. Weibliche BALB/c Mäuse wurden mit humanen TSHR-Plasmiden immunisiert und anschließend eine Elektroporation des Muskelgewebes

durchgeführt. In der Folge kam es zur TSHR-Antikörperbildung und Entwicklung einer Hyperthyreose. Außerdem wurden in beiden Studien Antikörper gegen den Insulin-like growth factor Rezeptor (IGF R1) nachgewiesen. Neben einer Vergrößerung der Schilddrüse konnte auch eine Fibrose des Orbitalgewebes sowie eine Zunahme des Fettgewebes und eine Hypertrophie der Muskelzellen nachgewiesen werden, die zu einer Protrusion der Augen führten (ZHAO et al., 2011; MOSHKELGOSHA et al., 2013).

2.2.1.7 Empfängliche Mausstämme

Die beschriebenen Studien haben gezeigt, dass nicht alle Mausstämme gleichermaßen empfänglich für die Induktion einer autoimmunen Hyperthyreose sind. So hat bei der Immunisierung mit Adenoviren die BALB/c Maus mit 50 % hyperthyreotischer Tiere die höchsten Erkrankungsraten gezeigt (NAGAYAMA et al., 2002). Auch bei DNA-Immunisierung und Immunisierung mit dendritischen Zellen konnte eine Hyperthyreose bei diesem Mausstamm ausgelöst werden. Mäuse vom Stamm BALB/c neigen verstärkt zu Immunantworten vom Typ TH2, also zu humoralen Immunantworten (MOSMANN & COFFMAN, 1989). Nagayama et al. sieht darin eine mögliche Ursache dafür, dass der Stamm BALB/c, eine höhere Affinität zum TH2-abhängigen M. Basedow hat (NAGAYAMA et al., 2002). Selbst innerhalb des Stamms BALB/c gibt es jedoch Unterschiede bei verschiedenen Unterstämmen. BALB/cJ Mäuse entwickeln häufiger eine Hyperthyreose als BALB/cByJ. Letztere weisen höhere Titer an blockierenden Antikörpern auf (SEETHARAMAIAH & LAND, 2006).

Auch beim Mausstamm C57BL/6 konnte bei 25 % der Tiere durch Adenovirus-Injektion eine Hyperthyreose erzeugt werden (NAGAYAMA et al., 2002).

Die Stämme DBA/1J, DBA/2J, CBA/J und SJL/J hingegen zeigten nach Immunisierung mit Adenoviren keine Veränderungen der Schilddrüse (NAGAYAMA et al., 2002).

Ein Vergleich von fünf Mauslinien, die alle das gleiche MHC-Molekül exprimieren, sich aber dennoch in Höhe des Antikörpertiters unterscheiden, gab Hinweise auf relevante Gensequenzen. Ob ein Mausstamm eine autoimmune Hyperthyreose entwickelt, scheint demnach insbesondere von non-MHC-Genen und nicht vom MHC-Haplotyp abzuhängen. (YAMAGUCHI et al., 1997)

Hinsichtlich der induzierten Antikörperentwicklung gegen den murinen, also endogenen TSHR zeigten BALB/c-Wildtyp-Mäuse Resistenzen. Bei TSHR-knock-out-BALB/c-Mäusen hingegen ließen sich bei 70 % der Tiere mittels Adenovirus-Immunisierung eine Antikörperbildung auslösen (NAKAHARA et al., 2012).

2.2.2 Anatomie und Histologie der Schilddrüse der Maus

Die Schilddrüse (Glandula thyroidea) liegt bilateral der Trachea zwischen Kehlkopf und dritten bis vierten Trachealring (siehe Abbildung 3). Bedeckt wird sie von der Larynxmuskulatur und den Speicheldrüsen. Die Sternomastoidmuskulatur liegt verglichen mit der des Menschen bei der Maus weiter lateral (MANCINI et al., 2009). Die Schilddrüse besteht aus zwei symmetrischen ca. zwei Millimeter langen und 0,5 Millimeter breiten Lappen (Lobus dexter und Lobus sinister), die über eine schmale Gewebebrücke (Isthmus glandulae thyroideae) verbunden sind. Die Schilddrüse sowie die beiden Nebenschilddrüsen werden bei der Maus von einer gemeinsamen fibrösen Kapsel umschlossen, die Septen ins Parenchym der Schilddrüse entlässt und sie dadurch in Lobuli unterteilt (DUBRAY LA PERLE & JORDAN, 2012).

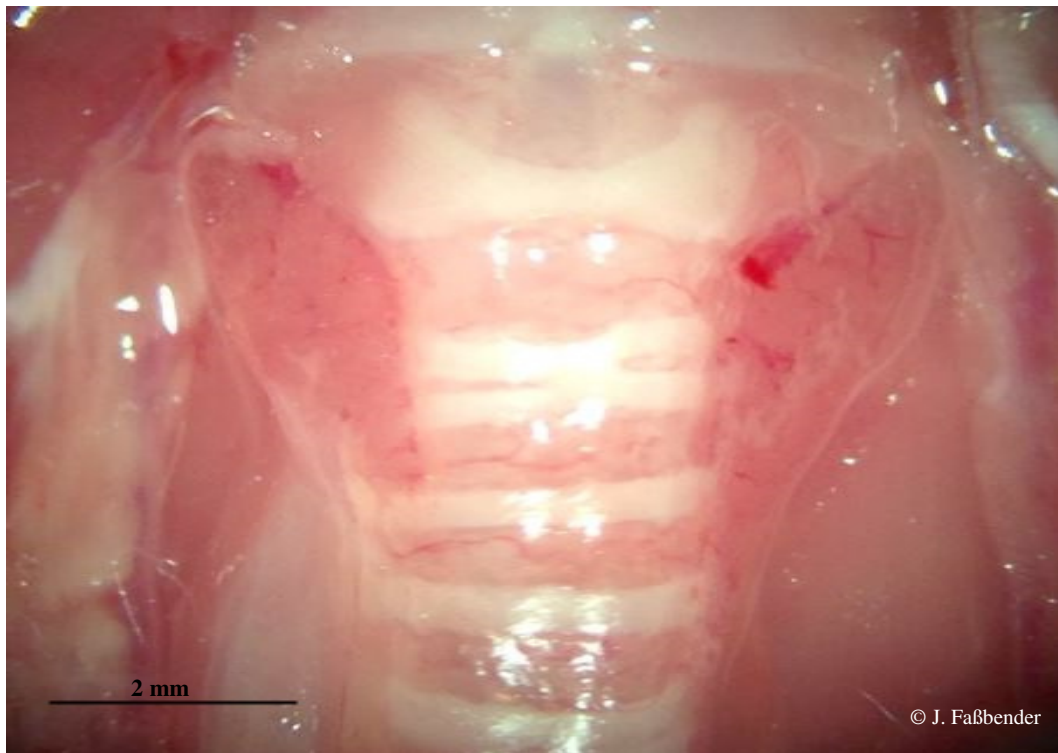
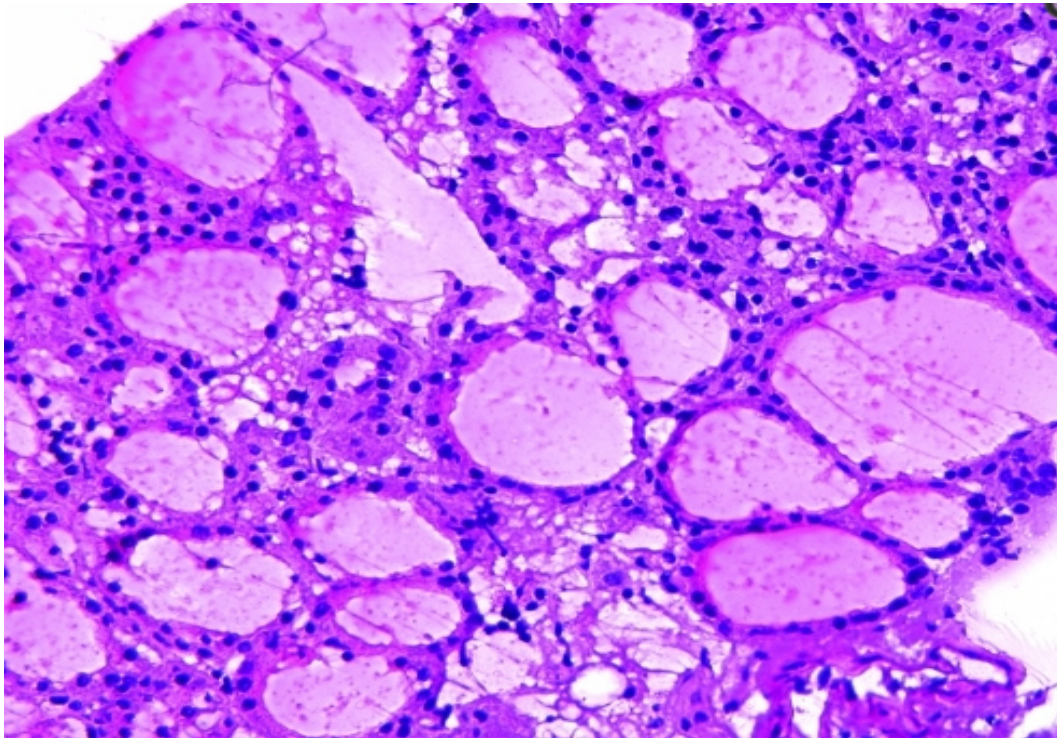


Abbildung 3: Situs der Schilddrüse

Die Lobi liegen beidseits des Kehlkopfes und der ersten Trachealringe. Der schmale Isthmus, der die beiden Lappen verbindet ist hier nicht zu erkennen.

Das histologische Bild wird dominiert von den kolloidgefüllten Schilddrüsenfollikeln, die von einem einschichtigen, isoprismatischen Epithel umgeben sind (siehe Abbildung 4). Lumenseitig sitzen den Follikelepithelzellen Mikrovilli auf. Hauptbestandteil des zentral gelegenen azidophilen Kolloids ist das Glykoprotein Thyreoglobulin, der Speicherort der Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 . Der zweite vorherrschende Zelltyp in der Schilddrüse sind die kalzetoninbildenden C-Zellen. Sie liegen in Gruppen von bis zu zehn Zellen meist im Zentrum der Lobi. C-Zellen sind nur mit Methoden der Histochemie bzw. Immunhistochemie nachweisbar. (DUBRAY LA PERLE & JORDAN, 2012).



**Abbildung 4: Histologisches Bild der Schilddrüse der Maus
(GANDHI & NIKIFOROV, 2011)**

2.2.3 Physiologische Herzfrequenz der Maus

Die Herzfrequenz der Maus wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich angegeben und reicht von 308 bpm (JONG et al., 2002) bis 668 bpm (GUO et al., 1998). Jedoch sind die unterschiedlichen Rahmenbedingungen der Studien zu bedenken. Die meisten Studien untersuchten die Herzfrequenz der Maus in Narkose. Für das wache Tier gibt Desai eine Frequenz von durchschnittlich 503 bpm an. In Aktivitätszeiten der Maus, z. B. bei der Fellpflege oder beim Fressen steigt die Frequenz auf 541 ± 17 bpm. Die Messung erfolgte mit einem zuvor operativ eingesetzten intravasalen Katheter (DESAI et al., 1997). Unterschiede ergeben sich außerdem aufgrund des Mausstammes und des Narkoseregimes. Zuurbier et al. untersuchten die Wirkung von Fentanyl-Fluanison-Midazolam (FFM), Ketamin-Medetomidin-Atropin (KMA) und Isofluran bei unterschiedlichen Mausstämmen. Während bei Tieren der Stämme C57Bl/6, CD-1 und Swiss unter Isofluran-Narkose eine höhere Herzfrequenz messbar war als mit FFM und KMA, war bei BALB/c Mäusen kein Unterschied feststellbar (ZUURBIER et al., 2002). Über den Einfluss des Geschlechts der Mäuse auf die Herztätigkeit werden in der Literatur widersprüchliche Angaben

gemacht. Eine Untersuchung von 2001 bescheinigt adulten weiblichen Tieren eine höhere Frequenz als männlichen. Zudem wurde eine Altersabhängigkeit beobachtet, wonach die Tiere mit steigendem Alter auch eine steigende Herzfrequenz zeigen (CHU et al., 2001). Eine Studie von Xing ergab jedoch eine höhere Frequenz bei männlichen Tieren, bestätigte allerdings eine Steigerung der Frequenz mit Zunahme des Alters für männliche Mäuse des Stammes BALB/c. Im Gegensatz dazu nimmt die Herzfrequenz bei Tieren des Stammes C57L/J, SM/J und P/J mit steigendem Alter ab. Eine Abhängigkeit der Frequenz vom Körpergewicht konnte nicht gezeigt werden (XING et al., 2009).

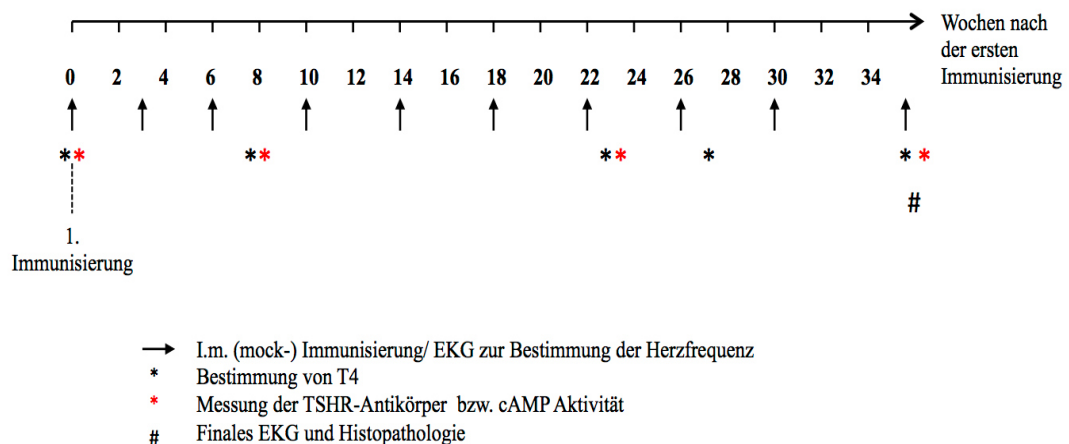
III. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Der Versuch wurde an 86 weiblichen Mäusen vom Stamm BALB/c durchgeführt. Die Tiere wurden im Alter von fünf Wochen von Charles River, Sulzfeld geliefert. Der erste Eingriff fand nach einer einwöchigen Eingewöhnungsphase statt. Die Mausgruppen, bestehend aus maximal zehn Tieren, wurden in konventionellen Makrolon-Käfigsystemen (GR1800DD, Tecniplast®) mit einer Grundfläche von 1800 cm² gehalten. Die Käfige waren mit Holzfasergranulat (Lignocel®, J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg), Nage- und Nestbaumaterial (Zellstoff, Nestlets, Nagehölzer) sowie Versteckmöglichkeiten (Smart-Haus für Mäuse, 130 x 90 x 60 mm, Fa. Bioscape) ausgestattet. Futter (extrudiertes Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse, ssniff Spezialdiäten GmbH) und Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die Temperatur im Tierraum betrug 22 ± 2 °C und die Luftfeuchtigkeit 55 ± 10 %.

Die Regierung von Oberbayern genehmigte den Tierversuch nach § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-25-12.

2. Zeitschema



3. Eingriffe am Tier

3.1 Immunisierung

Für die Immunisierung wurden die Mäuse mit Isofluran (Isofluran CP[®], CP-Pharma, Burgdorf) anästhesiert. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 5 % Isofluran, die Erhaltung mit 1,5 - 2 %. Während der Narkose lagen die Tiere zur Erhaltung der Körpertemperatur auf einer Wärmematte. Bei Erreichen des Toleranzstadiums wurde eine Augensalbe aufgetragen, um eine Austrocknung der Kornea zu verhindern (Bepanthen[®] Augensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen). Die Immunisierung erfolgte durch intramuskuläre Injektion in den rechten und linken Musculus quadriceps, wobei das Injektionsvolumen 25 µl je Seite umfasste.

34 Tiere erhielten ein Adenovirus, das die A-Domäne des TSHR (AS 1 – 289) exprimiert (Ad-TSHR). Das Virus wurde in zwei Konzentrationen verabreicht. 25 Tiere erhielten Immunisierungen mit dem Virustiter $1 * 10^{10}$ und neun Tiere mit dem Titer $1 * 10^{11}$. Einer Kontrollgruppe von 42 Tieren wurde ein Adenovirus verabreicht, das nicht die TSHR-Domäne trägt, dafür ein grün-floureszierendes Protein (Ad-GFP). Diese Tiere werden nachfolgend als „mock-immunisiert“ beschrieben. 32 Tiere erhielten das GFP-Virus in der Konzentration $1 * 10^{10}$, zehn Tiere in der Konzentration $1 * 10^{11}$. Zehn Mäuse wurden als zusätzliche Kontrollgruppe zu den mock-immunisierten Tieren mitgeführt. Sie erhielten keine Immunisierungen, aber in den gleichen Zeitabständen wie die anderen Tiere ein EKG sowie Blutentnahmen. Sie werden im Folgenden als „Nativ“-Gruppe bezeichnet. Die 34 TSHR-immunisierten Mäuse stammen ursprünglich aus einer größeren Tiergruppe. Nach drei Immunisierungen wurden diese 34 Tiere über eine T₄-Bestimmung als hyperthyreot charakterisiert. Der Cut-off wurde als Mittelwert + 2 * SD festgelegt. Tiere, deren Thyroxinwerte unterhalb dieser Grenze lagen, wurden von der Studie ausgeschlossen. Die Erkrankungsrate betrug ca. 80 %.

Das Immunisierungsprotokoll sah drei Immunisierungen im Abstand von 21 Tagen vor. Zwei Wochen nach der dritten Immunisierung wurde eine Blutprobe von allen Tieren gewonnen und hinsichtlich des T₄-Spiegels untersucht. Es folgten sechs weitere Immunisierungen im Abstand von 28 Tagen.

3.1.1 Adenovirus

Die ersten 289 Aminosäuren des TSH-Rezeptors wurden von Eurofins synthetisiert. Anschließend wurde das verwendete TSHR289-Adenovirus mit dem Microbix AdmaxTM System generiert. Die entstandenen Viren sind vom replikationsdefizienten Adenovirus Typ 5, dem die E1- und E2-Gensequenzen fehlen. Diese Gensequenzen (Early Genes) regulieren die Replikation der viralen DNA. Ein Kontroll-Adenovirus, das ein grün-fluoreszierendes Protein (GFP) exprimiert, wurde in gleicher Weise aufgereinigt.

Für die Herstellung der Viren wurden zwei verschiedene Plasmide verwendet: ein Shuttleplasmid (pcDC516), das die ersten 289 Aminosäuren des humanen TSHR beinhaltet und ein für das virale Genom codierendes Genomplasmid (pBHGfrt(del)E1,3FLP), das zusätzlich noch ein Gen für eine Rekombinase trägt. Beide Plasmide wurden in HEK293A Zellen transfiziert, die am Vortag in 10 cm großen Zellkulturschalen aufgebracht wurden. Für die Transfektion wurde CaCl₂ verwendet. Das Kulturmedium (DMEM + 10 % FBS + P/S) wurde 24 Stunden nach der Transfektion ausgetauscht und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert bis erste virale Plaques sichtbar waren, die vollständig mit einem Zellschaber abgelöst wurden. Die resultierende Zellsuspension wurde bei 1000 g fünf Minuten zentrifugiert. Das Adenovirus wurde unter Verwendung des Clontech Adeno-XTM Systems nach Herstellerangaben aufgereinigt. Um den Titer der viralen Partikel zu bestimmen, wurden die Proben im Verhältnis 1:10 mit PBS und 0,1 % SDS verdünnt und anschließend zehn Minuten bei 56 °C inkubiert. Dann wird die optische Dichte bei 260 nm im Vergleich zu PBS + 0,1 % SDS gemessen.

3.2 Bestimmung der Herzfrequenz

Für die Bestimmung der Herzfrequenz wurden die Mäuse mit Isofluran anästhesiert. Die Messung erfolgte mit dem Electrocardiogramm Amplifier Typ 689 von Hugo Sachs Elektronik und wurde mit dem Softwareprogramm Haemodyn (Hugo Sachs Elektronik) aufgezeichnet. Der Verlauf der Herzfrequenz wurde über drei bis vier Minuten beobachtet. Bei den meisten Tieren stellte sich nach dieser Zeit ein gleichmäßiger Verlauf ein (s. Abbildung 6). Der Wert dieses

Plateaus wurde dokumentiert. Die Untersuchung fand vor jeder Immunisierung sowie am Ende des Versuchs statt.

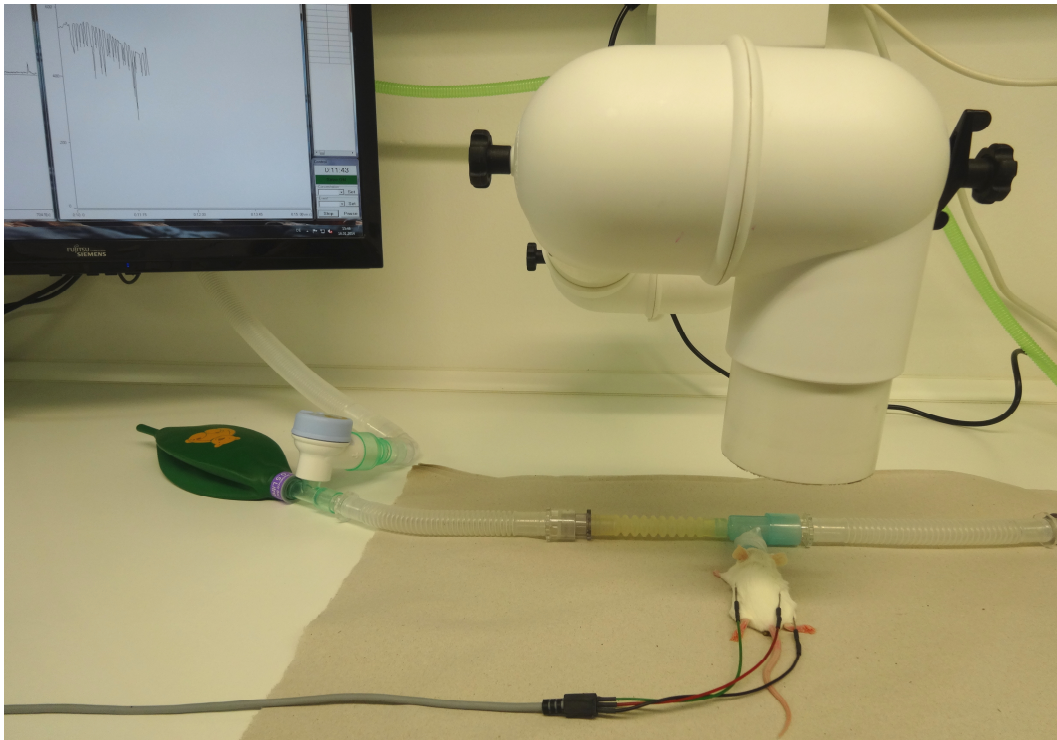


Abbildung 5: Versuchsaufbau

Die Inhalationsnarkose erfolgt über eine Kopfkammer. Um ein Absinken der Körpertemperatur in Narkose zu verhindern, liegt die Maus auf einer Wärmematte. Die EKG-Nadeln werden subkutan eingestochen und der Verlauf der Herzfrequenz über mehrere Minuten aufgezeichnet.

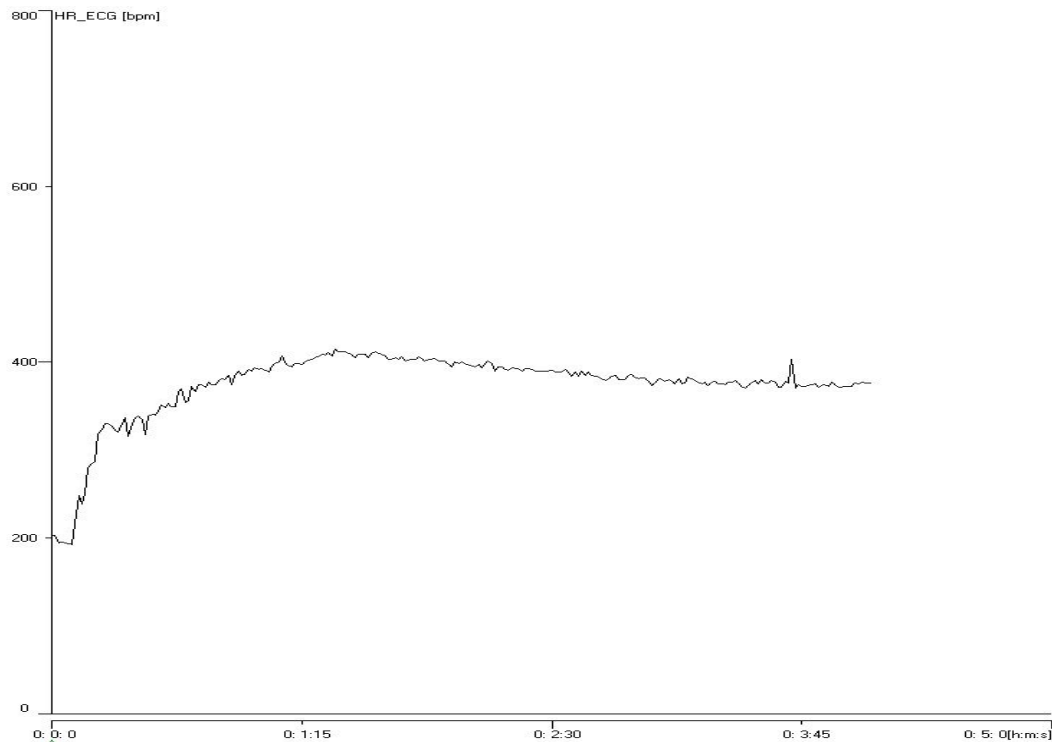


Abbildung 6: Verlauf der Herzfrequenz über vier Minuten

Nach einem steilen Anstieg der Frequenz zu Beginn, stellt sich nach ca. 1,5 Minuten ein konstantes Plateau ein.

3.3 Blutentnahmen

Für die Blutentnahme wurde das Tier in einem Restraîner fixiert. Nach Hyperämisierung durch Infrarotbestrahlung und durch Wärmekissen wurden 100 µl Blut unter aseptischen Bedingungen aus der Schwanzvene entnommen. Die Punktion erfolgte mit einer 27 G Kanüle. Eine Stunde nach der Entnahme wurde das Blut bei 2400 g 15 Minuten lang zentrifugiert (Biofuge Pico, Heraeus). Das Serum wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

Die erste Blutentnahme fand zu Versuchsbeginn vor der ersten Immunisierung (Tag 0) für eine basale T_4 und cAMP Messung statt, außerdem in den Versuchswochen 8, 23 und 27.

Bei Versuchsende (Woche 35) wurde eine finale Blutentnahme durchgeführt. Die kardiale Punktion erfolgte unter Anästhesie des Tieres (170 mg/kg Ketamin, 17 mg/kg Xylazin). Die mit der Blutentnahme verbundene Euthanasie erfolgte somit tierschutzgerecht nach den gesetzlichen Bestimmungen der Bundesrepublik Deutschland.

3.3.1 Bestimmung der TSHR-Antikörper und der cAMP-Aktivität

Für den Nachweis von anti-TSHR-Antikörper wurden zwei verschiedene ELISA-Systeme verwendet. Zum einen der aktuelle Goldstandard in der humanen Morbus Basedow-Diagnose, der „3rd Generation Immunoassay“, dessen Prinzip die Verdrängung von markierten monoklonalen M22-Antikörpern (M22-Peroxidase) durch TRAK-positive Serumproben ist. Dieser Assay weist eine Spezifität und Sensitivität von > 97 % auf (KAMIJO et al., 2005; TOZZOLI et al., 2012). Das Testsystem wurde zur Verfügung gestellt von RSR Limited, Avenue Park, Pentwyn, Cardiff, UK und wurde für die Bestimmung der Inhibition in Prozent mit 3 µl Serum 1:10 verdünnt nach Herstellerangaben angewendet. Bei Proben, bei denen der Wert in dieser Verdünnung nicht bestimmbar war, wurden die Seren in der Verdünnung 1:100 eingesetzt. Die gemessene optische Dichte wurde mit der Formel $\frac{\text{Optische Dichte der Probe bei 450 nm}}{\text{Optische Dichte der Negativkontrolle bei 450 nm}} \times 100$ in Inhibition in Prozent übertragen. Die Inhibition in Prozent wurde anschließend mit der Software Sigmaplot 11.0 (Systat Software Inc) in die Einheit U/l umgerechnet. Die Verdünnungsstufe (1:10 oder 1:100) wurde anschließend wieder multipliziert. Die Messungen fanden in den Versuchswochen 8, 23 und 35 statt.

Zusätzlich wurde bei einem Teil der Tiere (insgesamt n = 44) ein Assay der zweiten Generation aus der Humanmedizin verwendet (RSR Limited, Avenue Park, Pentwyn, Cardiff, U. K.). Gemessen wurde die Inhibition der TSH Bindung mit 10 µl Serum 1:3 verdünnt. Aufgrund nicht ausreichender Serummengen konnte diese Untersuchung nicht bei allen Tieren durchgeführt werden.

Außerdem wurden stimulierende Antikörper im Mausserum über den Nachweis von cAMP in CHO-Zellen JP2626 gemessen, die den TSHR exprimieren (zur Verfügung gestellt von Dr. Gilbert Vassart, Brüssel, Belgien). Die CHO-Zellen wurden in 96-well Platten (30000 Zellen pro well) gegeben und 24 Stunden mit Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen Ltd), das 2 % fetales Kalbsserum enthält, inkubiert. Das Mausserum wurde 1:8 mit 40 µl HBSS Puffer (20 mM Hepes, 1,26 mM CaCl₂, 5,33 mM KCl, 0,44 mM KH₂PO₄, 0,5 mM MgCl₂, 0,4 mM MgSO₄, 4,2 mM NaHCO₃, 5,6 mM Glucose und 222 mM Sucrose, pH 7,2) verdünnt und nach Entfernung des DMEMs in die wells gegeben. 1,5 % BSA und 0,5 mM Isobutyl-1-methylxanthine (Sigma_Aldrich, Pole, UK) wurden supplementiert. Nach 2,5 Stunden Inkubationszeit bei 37 °C

wurde die cAMP Freisetzung mit einem kompetitiven Immunoassay (# EMSCAMPL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gemessen.

3.3.2 Bestimmung von T₄

T₄ total wurde mit einem kommerziellen Immunoassay Kit (Mouse/Rat Thyroxine ELISA, # T4044T-100, Calbiotech Inc, CA U.S.A.) nach Herstellerangaben in den Versuchswochen 0, 8, 23, 27 und 35 gemessen.

3.4 Klinische Allgemeinuntersuchung

Die Tiere wurden einmal wöchentlich sowie vor jedem Eingriff klinisch untersucht. Der Gewichtsverlauf, sowie die Beurteilung von Atmung, Allgemeinbefinden, Körperhaltung, Abdomen, Gliedmaßen, Pflegezustand, Haut- bzw. Fellzustand, Augen und Injektionsstellen wurden in Score-Sheets dokumentiert. Abweichungen vom physiologischen Normalzustand wurden über ein Punkteschema klassifiziert (s. Anhang Tab. 9). Bei hochgradigen pathologischen Veränderungen wäre das Tier umgehend euthanasiert worden.

3.5 Histologische Untersuchung der Schilddrüsen

Um mikroskopische Veränderungen der Schilddrüse darzustellen, wurden nach der Euthanasie der Tiere histologische Schnitte der Schilddrüse angefertigt. Zunächst wurde die Maus makroskopisch beurteilt und falls vorhanden wurden offensichtliche Veränderungen an Augen, Fell, Haut, Schleimhaut und Körperöffnungen protokolliert. Anschließend wurde der Tierkörper mit Ethanol gereinigt und Bauch- und Brusthöhle eröffnet. Sofern keine pathologischen Veränderungen vorlagen, wurden die inguinalen, axialen und mandibulären Lymphknoten entnommen und in 4 %igem Paraformalin fixiert. Die inneren Organe wurden hinsichtlich ihrer Lage, Größe, Form und Farbe begutachtet und Abweichungen wurden dokumentiert. Nach der Inspektion der Körperhöhlen wurden Leber, Milz, Lunge, Nieren und Herz vorsichtig entnommen, mit kalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in Paraformalin fixiert.

Die Entnahme der Schilddrüse erfolgte unter dem Stereomikroskop. Besondere Aufmerksamkeit galt der Positionierung der Maus, da es sonst leicht zu Fehlinterpretationen der Lage der Schilddrüse kommen kann. Die Maus lag in Rückenlage und der Hals wurde überstreckt. Dann wurden unter mikroskopischer Kontrolle die Speicheldrüsen zur Seite präpariert und der darunterliegende Muskelstrang durchtrennt, sodass die Trachea sichtbar wurde. Die laterale Muskulatur wurde nun durchschnitten und die Trachea vorsichtig mit der Pinzette gefasst. Anschließend wurde sie in Höhe des Larynx sowie des siebten Trachealrings abgesetzt und mitsamt der Schilddrüse und dem Oesophagus entnommen.

Das Gewebe wurde für zehn Minuten in 4 %iges neutrales PFA gegeben und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurde es in OTC (Tissue-Tek Oct compound, Sakura, IMEA) eingebettet, auf Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

Die histologischen Schnitte wurden mit einem Leica Microtom CM 1850 Cryostat bei einer Temperatur von -19 °C angefertigt. Die Schnitte waren 5 µm dick und im Abstand von je 500 µm. Sie wurden bis zur Färbung bei -80 °C gelagert.

Die Färbung fand bei Raumtemperatur mit Hämatoxylin-Eosin statt.

Die mikroskopische Begutachtung erfolgte mit dem ZEISS Axio Scope A1 und die Aufnahme der Bilder mit der ZEISS AxioCam ERc 5s sowie der Software Axio Vision. Die Berechnung des Schilddrüsenvolumens erfolgte über Addition der Flächen der einzelnen Schnitte multipliziert mit dem Schnittabstand. Es ergab sich die Formel $\text{Volumen (mm}^3\text{)} = (S1 + S2 + \dots S_n) \times 0,5 \text{ mm}$.

Die Herzen der Mäuse wurden nach der Entnahme gewogen und anschließend in KCl gegeben, damit sich alle Herzen in der Diastole befinden und dadurch eine Vergleichbarkeit gegeben ist. Anschließend wurden sie in gleicher Weise präpariert wie die Schilddrüsen und die Schnitte mit Sirius-Red-Färbung gefärbt, um auch den Kollagengehalt der Organe darzustellen.

4. Statistik

Zunächst wurde eine deskriptive Statistik erstellt, die die Parameter Anzahl (n), arithmetisches Mittel, Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SEM) enthält. Mittelwerte, Standardabweichung und Standardfehler wurden mit Excel (Microsoft, Version 2007) ermittelt. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels einfacher Varianzanalyse (SPSS Software, Version 19) bestimmt. Anschließend wurde die Signifikanz mit post-hoc-Tests in Form von LSD-Tests (least significant difference) überprüft. Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten wurden mit der gleichen Software mittels ANOVA für Messwiederholungen berechnet.

Zur Quantifizierung der Unterschiede wurden die relativen Unterschiede in Prozent und die Effektgröße nach Cohen bestimmt. Die Effektgröße wurde mit der Formel für Mittelwertsunterschiede zweier verschieden großer Gruppen nach Cohen berechnet. Effektgrößen von $d = 0,2$ gelten als kleine, $d = 0,5$ als mittlere und $d = 0,8$ als große Effekte (NAKAGAWA & CUTHILL, 2007). In dieser Arbeit wurden biologische Unterschiede ab einem relativen Unterschied von 5 % bzw. $0,5 d_{\text{Cohen}}$ als signifikant diskutiert.

IV. ERGEBNISSE

1. Klinische Allgemeinuntersuchung

Eine Maus aus der Gruppe der Nativtiere verstarb einige Tage nach dem ersten EKG spontan ohne äußere Auffälligkeiten. Die Anzahl der Nativtiere, die in die Untersuchungsergebnisse eingingen betrug somit $n = 9$. Selten reagierten einzelne Tiere auf die Blutentnahmen mit einer milden Infektion an der Einstichstelle, die mit täglichen Braunolbädern (Braunol[®], wässrige Lösung, B. Braun) und einem Hautpflegespray (Skin Care Powder Aerosol, Henry Schein) behandelt wurde und nach wenigen Tagen abgeklungen war. Eine der TSHR-immunisierten Mäuse wurde sechs Monate nach Versuchsbeginn von den anderen Tieren der Gruppe angegriffen und gejagt und wies Bisswunden an Schwanzbasis, Bauch und Oberschenkeln auf. Sie wurde einen Tag mit Metamizol (Novalgin[®] Tropfen, Sanofi-Aventis, Frankfurt am Main) oral behandelt (20 mg/kg, einmal täglich). Nach einem erfolglosen Versuch sie in eine andere Gruppe zu integrieren, wurde dieses Tier bis Versuchsende alleine gehalten. Sieben Tiere (sowohl aus den TSHR-immunisierten, als auch den GFP-Tiergruppen) entwickelten vorübergehend eine milde Konjunktivitis, die mit antibiotischer Augensalbe, Wirkstoff Ofloxacin (Floxal[®] Augensalbe, Dr. Mann Pharma und Bausch & Lomb GmbH, Berlin) und Dexpantenol (Bepanthen[®] Augensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) behandelt wurde und nach einigen Tagen abklangen.

2. Laborergebnisse

2.1 Anti-TSHR Antikörpertiter und cAMP Aktivität

Stimulierende anti-TSHR-Antikörper wurden mit drei verschiedenen Verfahren gemessen. Bei allen drei Verfahren waren bei den TSHR-immunisierten Tieren Antikörpertiter nachweisbar. Im „3rd Generation Assay“ waren bei diesen Mäusen signifikant erhöhte Titer ($p < 0,005$) im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu allen drei Messzeitpunkten nachweisbar (s. Abbildung 7). Bei der ersten Untersuchung in Woche 8 waren 85,5 U/l bzw. 150,95 U/l bei den TSHR-immunisierten Mäusen messbar. Der Wert stieg in Woche 23 auf durchschnittlich 258,22 U/l bei den Tieren, die das Adenovirus-TSHR in der

Konzentration $1 * 10^{10}$ erhielten und auf durchschnittlich 263,27 U/l bei den Tieren mit dem Virustiter $1 * 10^{11}$. Dies entspricht einem relativen Anstieg von 202 % für den Titer $1 * 10^{10}$ und 74 % für den Titer $1 * 10^{11}$ bzw. eine Effektgröße von $d_{\text{Cohen}} = 1,61$ und für den höheren Titer $d_{\text{Cohen}} = 0,76$. Bei der finalen Messung in Woche 35 fiel der Titer bei beiden Gruppen ab auf 200,11 U/l bzw. 172,02 U/l. Anstieg und Abfall der Antikörpertiter bei den TSHR-immunisierten Tieren waren statistisch signifikant ($p < 0,005$). Im Serum der mock-immunisierten Tiere waren Werte zwischen 0 und durchschnittlich 4 U/l messbar. Die nativen Mäuse liegen leicht darüber mit Werten zwischen 3,2 und 9,8 U/l.

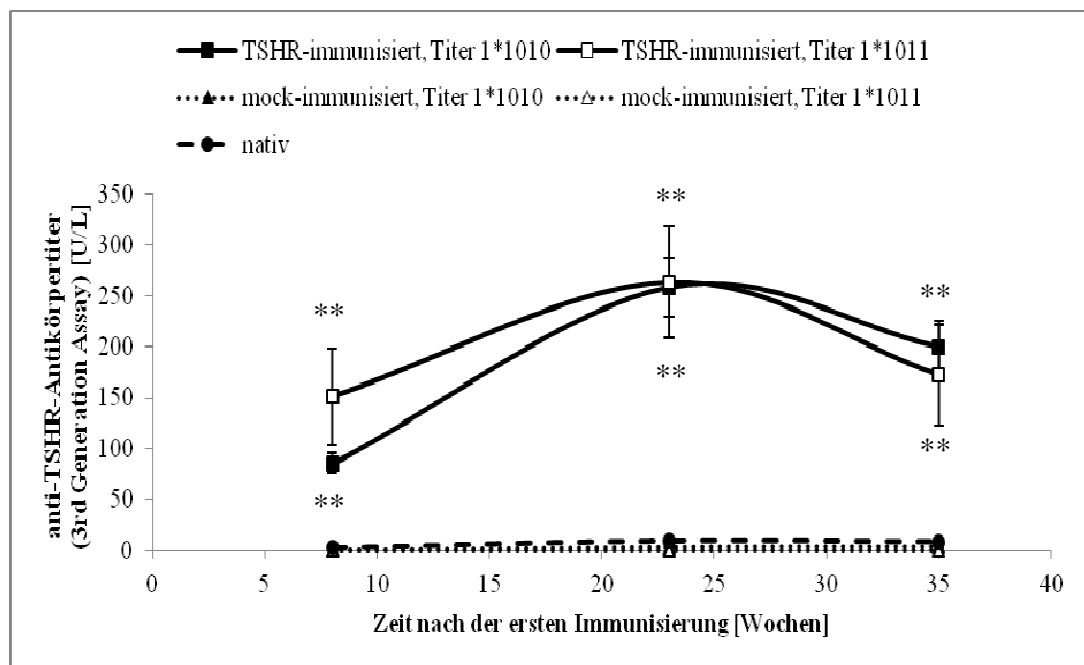


Abbildung 7: Verlauf des Antikörpertiters im 3rd Generation Assay

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Die Signifikanz wurde mit ANOVA gefolgt von LSD post-hoc Tests überprüft. Die statistische Signifikanz (dargestellt mit **) beträgt $p < 0,005$ für die TSHR-immunisierten Tiere verglichen mit den Kontrollgruppen je innerhalb eines Messzeitpunktes.

Die Ergebnisse des ELISA der zweiten Generation in Versuchswoche 35 zeigen bei den TSHR-immunisierten Tieren eine Inhibition der TSH-Bindung zum TSH-Rezeptor von 70,54 % bzw. 73,23 % (s. Abbildung 8). Bei allen Mäusen dieser Gruppen waren mit dieser Methode Antikörper im Serum nachzuweisen. Die mock-immunisierten Tiere zeigten keine Inhibition. Die Unterschiede zwischen

den Antikörpertitern der TSHR-immunisierten Mäuse und denen der mock-immunisierten waren statistisch signifikant mit $p < 0,001$ und Effektgrößen von $d_{\text{Cohen}} = 15,33$ (TSHR-immunisiert versus mock-immunisiert, Titer $1 * 10^{10}$) und $d_{\text{Cohen}} = 7,81$ (TSHR-immunisiert versus mock-immunisiert, Titer $1 * 10^{11}$). Der relative Unterschied beträgt 120 % für die Gruppen mit niedrigem Titer und 106 % für den höheren.

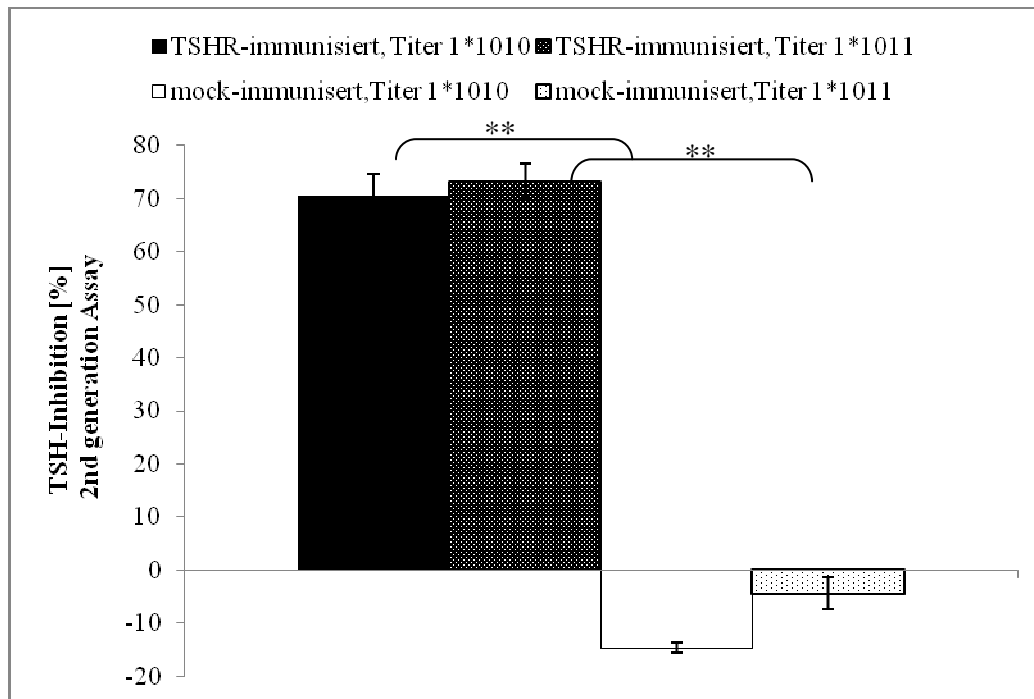


Abbildung 8: TSH-Inhibition im 2nd Generation Assay.

Die Signifikanz beträgt $p < 0,001$ für die TSHR-immunisierten Gruppen verglichen mit den mock-immunisierten. Der Unterschied zwischen den beiden TSHR-immunisierten Gruppen ist nicht signifikant.

Als zusätzlicher Parameter diente der Nachweis von cAMP in CHO-Testzellen, die den TSHR exprimieren. Eine cAMP-Aktivität war bei den TSHR-immunisierten Tieren ab der zweiten Messung durchgängig nachweisbar (s. Abbildung 9). Nach einem Ergebnis von 3,21 pmol/ml in Versuchswoche 0 bei den TSHR-immunisierten Mäusen (Virustiter $1 * 10^{10}$) bzw. 6,80 pmol/ml (Virustiter $1 * 10^{11}$), stieg dieser Wert in der folgenden Messung in Woche 8 signifikant an auf 28,85 pmol/ml bzw. 64,85 pmol/ml. Sowohl der Anstieg als auch der Unterschied zu den mock-immunisierten Tieren war signifikant mit $p < 0,05$ bzw. $p < 0,005$. Die Effektgröße von Woche 0 zu Woche 8 bei den

TSHR-immunisierten Tieren (Titer $1 \cdot 10^{10}$) beträgt $d_{\text{Cohen}} = 0,85$ bzw. $d_{\text{Cohen}} = 1,83$ (Titer $1 \cdot 10^{11}$). Dies entspricht einem relativen Anstieg von 899 bzw. 954 %. Die Werte stiegen bei der Messung in Woche 27 erneut an auf 37,98 pmol/ml und 82,52 pmol/ml. Der Unterschied zu den mock-immunisierten Mäusen zu diesem Zeitpunkt entspricht einer Effektgröße von 0,70 (Titer $1 \cdot 10^{10}$) bzw. 1,67 (Titer $1 \cdot 10^{11}$). Bei der finalen Messung in Woche 35 fiel die cAMP Aktivität auf 30,70 bzw. 55,42 pmol/ml. Dies entspricht einem Abfall von 19 % bzw. 33 %. Bei den mock-immunisierten Mäusen bewegte sich die gemessene cAMP-Aktivität zwischen 4,21 und 11,69 pmol/ml, bei den Nativtieren zwischen 1,45 und 3,40 pmol/ml.

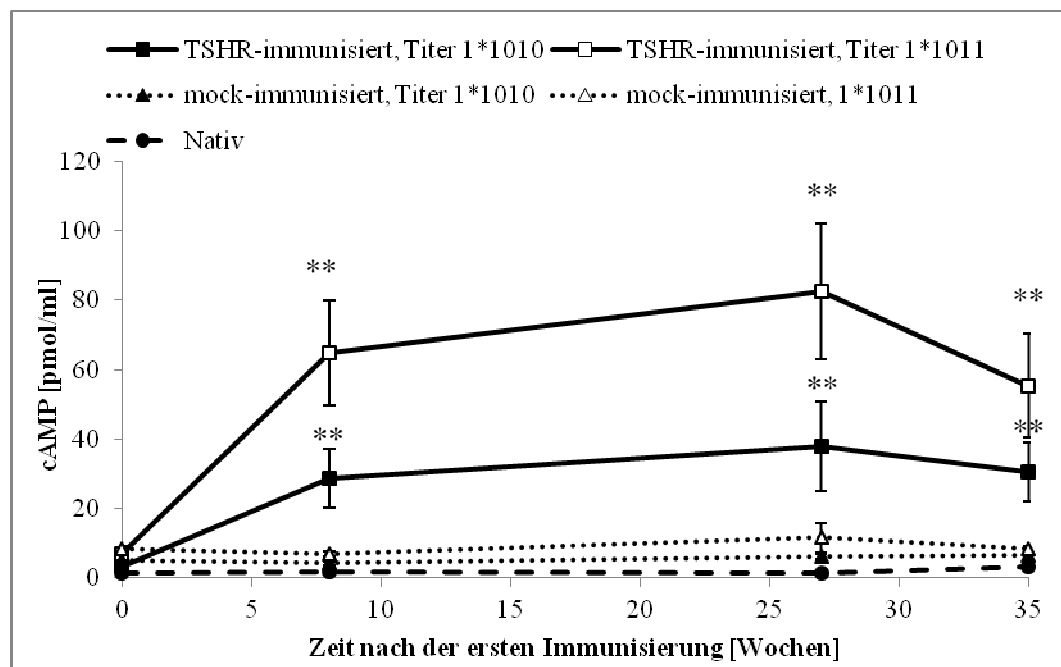


Abbildung 9: Verlauf der cAMP Aktivität in CHO-Testzellen zu fünf Messzeitpunkten

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Die Signifikanz wurde mit der Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen getestet, gefolgt von LSD post-hoc Tests. ** $p < 0,005$ für die TSHR-immunisierte Gruppen verglichen mit den mock-immunisierten (Titer-vergleichend).

2.2 T₄-Serumspiegel

Bei der ersten Messung zu Studienbeginn zeigten alle fünf Gruppen vergleichbare T₄-Werte im Serum (siehe Abbildung 10). Sie lagen zwischen 5,2 und 6,1 $\mu\text{g/dl}$. Bei der zweiten Untersuchung in Versuchswoche 8 waren die Thyroxinspiegel der

TSHR-immunisierten Gruppen signifikant höher als die Werte der mock-immunisierten und der nativen Tiere ($p < 0,001$). Bei der TSHR-immunisierten Gruppe, die den Virustiter $1 * 10^{10}$ erhielt, stieg der Wert auf $10,86 \mu\text{g/dl}$ und fiel bei den folgenden Untersuchungen in den Versuchswochen 23 und 27 auf durchschnittlich $10,33$ und $10,14 \mu\text{g/dl}$. Bei der letzten Untersuchung in Woche 35 fiel dieser Wert erneut leicht ab auf durchschnittlich $9,25 \mu\text{g/dl}$. Aber auch die Ergebnisse der letzten beiden Untersuchungen waren signifikant höher als die Messergebnisse der mock-immunisierten Gruppen ($p < 0,05$). Die Effektgrößen bewegen sich in Größenordnungen von $d_{\text{Cohen}} = 4,22$ (Woche 8) bis $d_{\text{Cohen}} = 2,04$ (Woche 35). Auch die TSHR-immunisierten Mäuse mit dem Titer $1 * 10^{11}$ zeigten den höchsten T_4 -Wert in Versuchswoche 8 mit $8,91 \mu\text{g/dl}$ und fielen anschließend kontinuierlich ab. Bei der finalen Messung betrug der Wert schließlich $5,08 \mu\text{g/dl}$ und lag damit leicht unterhalb des Wertes der Nativtiere. Beide TSHR-immunisierten Gruppen zeigten als gepoolte Gruppe einen signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) in den Versuchswochen 0 bis 27 verglichen mit den mock-immunisierten Tieren. Die mock-immunisierten Tiere zeigten relativ konstante T_4 -Spiegel um die $5 \mu\text{g/dl}$. In Woche 27 stieg auch bei diesen Gruppen der Wert leicht an auf $6,00$ bzw. $7,61 \mu\text{g/dl}$, der in der 35. Woche wieder abfiel. Sie lagen jedoch zu allen Zeitpunkten unterhalb der Werte der TSHR-immunisierten Gruppe mit dem Titer $1 * 10^{10}$. Auch die nativen Mäuse zeigten beständige Thyroxinlevel zwischen $5,2$ und $6,7 \mu\text{g/dl}$.

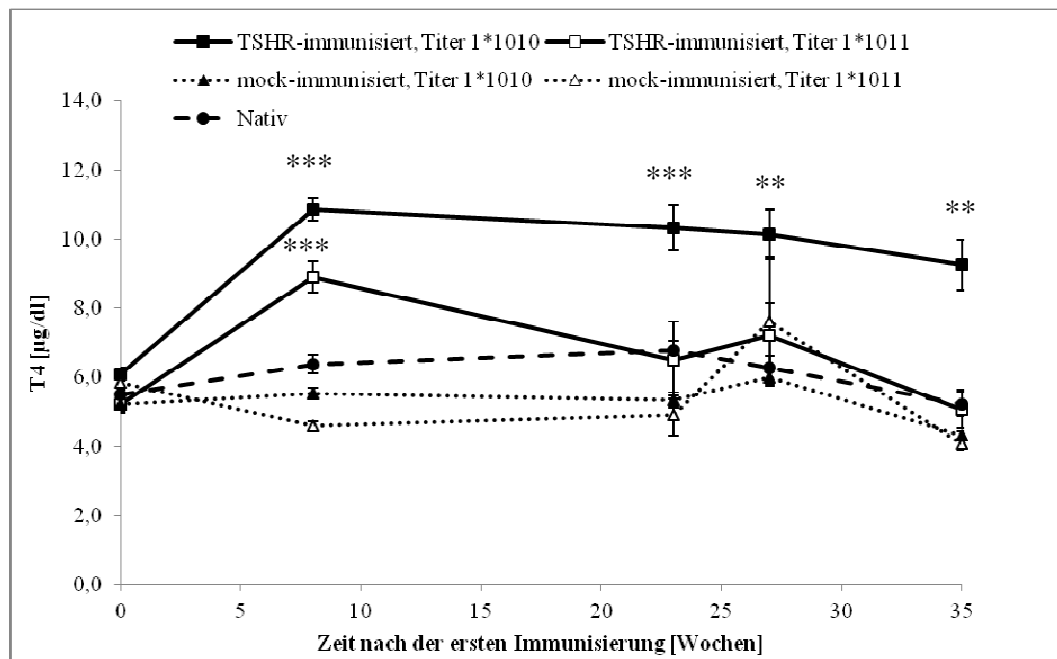


Abbildung 10: Verlauf der T₄ Konzentration im Serum

T₄-Spiegel wurden zu fünf Zeitpunkten bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mit der Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen getestet, sowie mit dem LSD post-hoc Test. ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$ für die TSHR-immunisierten Gruppen verglichen mit den mock-immunisierten (Titer-vergleichend).

3. Effekt der Immunisierung auf die Herzfrequenz

Bei Versuchsbeginn zeigten sowohl die TSHR-immunisierten als auch die GFP-Gruppen eine vergleichbare Herzfrequenz (387 bpm bzw. 403 bpm bei den TSHR-immunisierten Tieren und 396 bpm bei beiden GFP-Gruppen; s. Abb. 11). Die Nativtiere lagen etwas höher bei 440 bpm. Schon nach der dritten Immunisierung (Tag 42) zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Frequenz bei den TSHR-immunisierten Mäusen (482 bzw. 454 bpm, entsprechen 21 bzw. 10 % Erhöhung zum Basalwert). Die mock-immunisierten Tiere, die mit dem Virustiter $1 \cdot 10^{10}$ immunisiert wurden, hatten zu diesem Zeitpunkt eine Herzfrequenz von durchschnittlich 408 bpm (entspricht einer Erhöhung um 4 %) und die GFP-Gruppe mit dem Virustiter $1 \cdot 10^{11}$ liegt bei 429 bpm (Erhöhung um 9 %). Die Nativgruppe hingegen fiel ab auf durchschnittlich 383 bpm. Bis zur 6. Immunisierung (126. Tag) stieg die Frequenz bei den TSHR-immunisierten

Tieren weiter an auf durchschnittlich 556/546 bpm (45/36 %) versus 426/490 bpm (9/24 %) bei den GFP-Gruppen. Die Nativtiere fielen nochmals leicht ab auf 361 bpm. Bis zur letzten Messung an Tag 245 hielten die TSHR-immunisierten Tiere in etwa die Höhe der Herzfrequenz, während die GFP- und Nativgruppen einen leichten Anstieg verzeichneten. Die Unterschiede zwischen TSHR-immunisierten und mock-immunisierten Tieren war zwischen der vierten Messung in Woche 10 und der Finalmessung in Woche 35 bis auf eine Ausnahme immer signifikant mit $p < 0,05$ bis $p < 0,001$ (s. Abb. 11).

Tiere mit erhöhter Herzfrequenz zeigten in der Regel eine Sinustachykardie. Abbildung 12 zeigt repräsentativ die Entwicklung der Herzfrequenz bei einem Ad-TSHR-immunisierten Tier zu drei Messzeitpunkten.

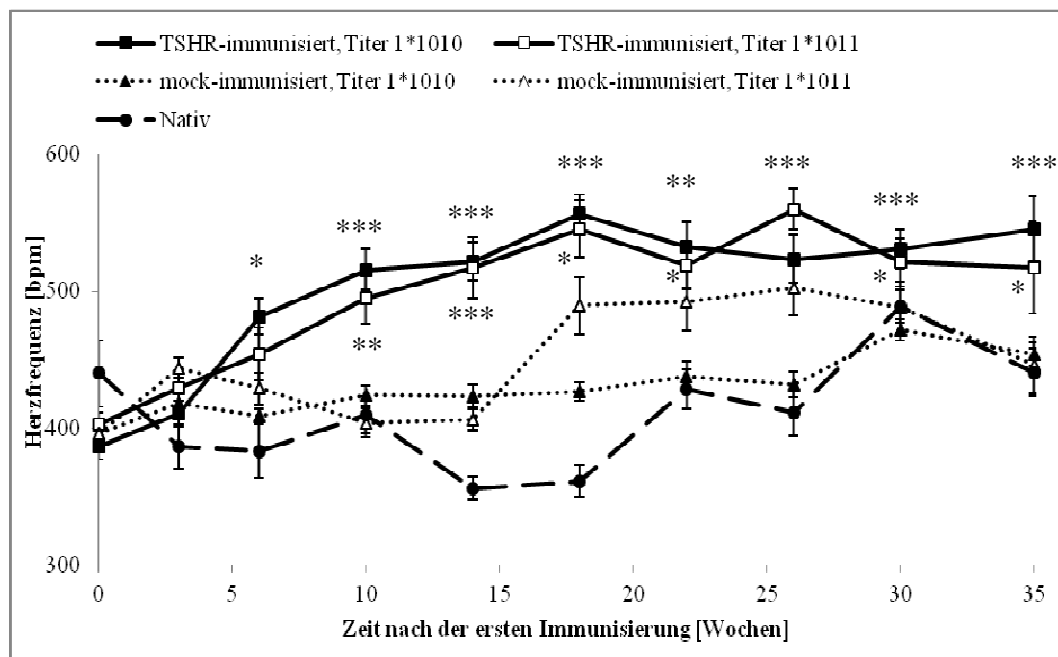


Abbildung 11: Verlauf der Herzfrequenz

der beiden immunisierten, sowie der mock-immunisierten und nativen Gruppen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$ für die TSHR-immunisierten Tiere verglichen mit den Kontrollgruppen.

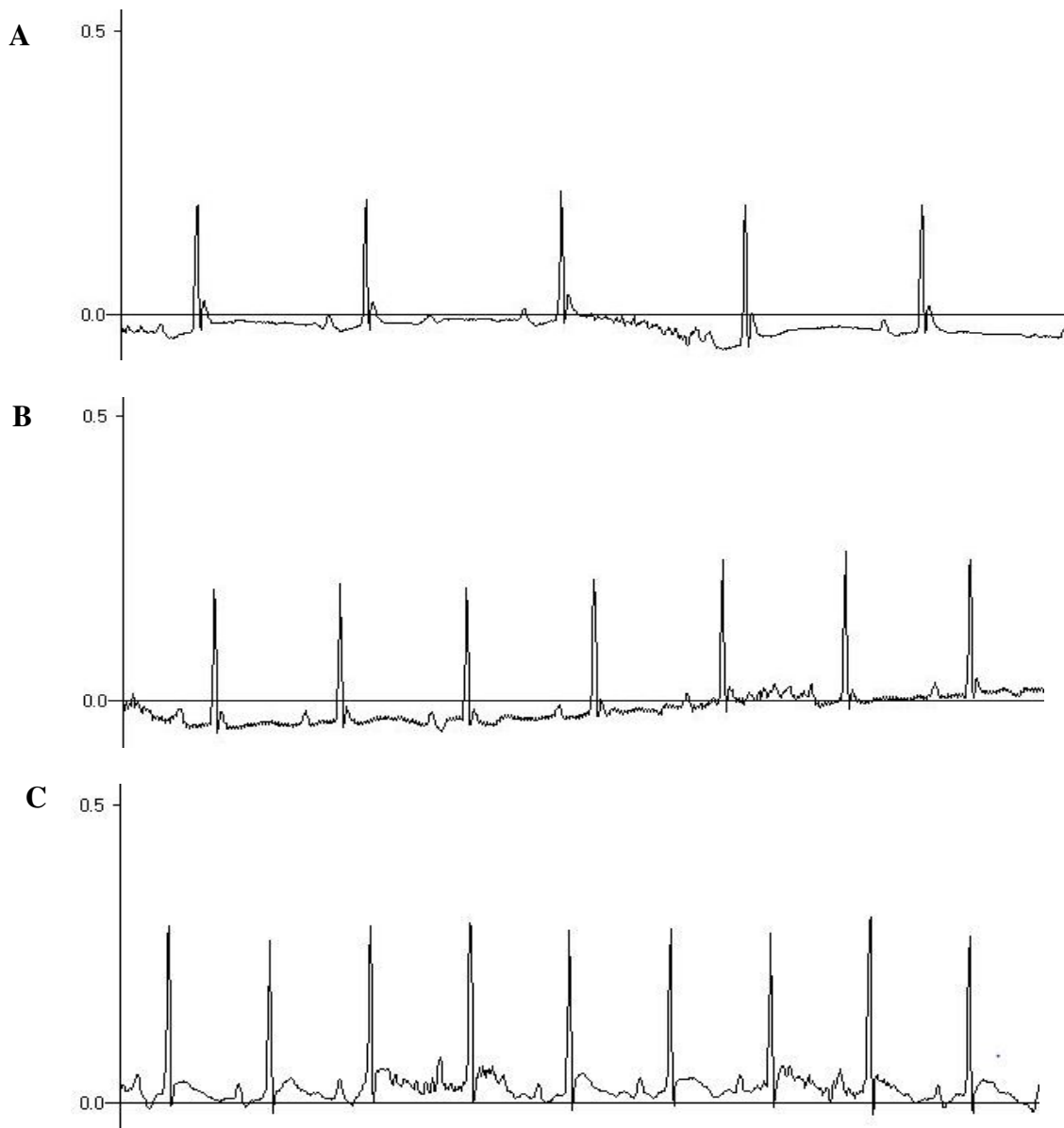


Abbildung 12: Steigerung der Herzfrequenz im Verlauf der Studie

Gezeigt ist die Herzfrequenz desselben TSHR-immunisierten Tieres am Tag 0 (Abb. A) und an den Tagen 42 (Abb. B) und 154 (Abb. C).

4. Histopathologische Ergebnisse

Bei der histopathologischen Untersuchung wurde neben der Vermessung von Schilddrüse und Herz auch eine qualitative Untersuchung des Schilddrüsengewebes vorgenommen. Hier wurden insbesondere die Follikelgröße sowie die Beschaffenheit des Follikelepithels berücksichtigt.

Bei der TSHR-immunisierten Gruppe fielen eine deutliche Faltung sowie eine Hyperplasie des Follikelepithels auf. Durch die Epitheleinstülpungen ergab sich

eine Fraktionierung und Verkleinerung der Follikel und eine Reduzierung der Kolloidmasse. Auffällig ist außerdem die deutliche Vakuolisierung der Follikel. Das Schnittbild der TSHR-immunisierten Tiere wirkt deutlich basophiler als das der Kontrollgruppen. Die nativen und mock-immunisierten Tiere zeigten eine unauffällige Gewebestruktur mit großen, kolloidgefüllten Follikeln, die von einem einschichtigen Epithel umgeben waren. Abbildung 13 zeigt repräsentative Bilder aller Gruppen.

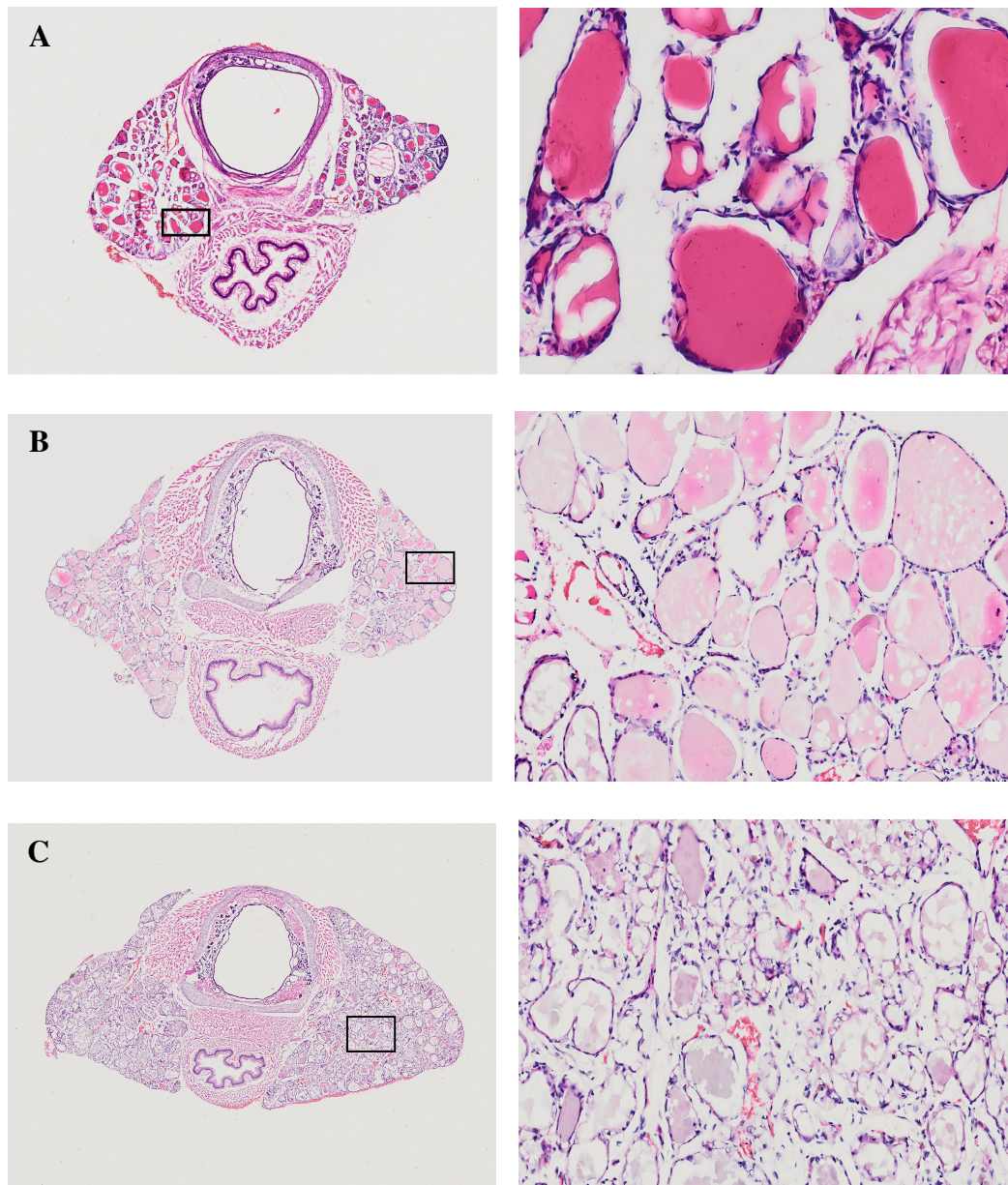


Abbildung 13: Effekt der Immunisierungen im histologischen Bild

Abb. A zeigt die Schilddrüsenfollikel eines nativen Tieres, Abb. B einer mock-immunisierten Maus (Titer $1 * 10^{10}$) und Abb. C zeigt das zerklüftete Kolloid und Epitheleinstülpungen bei einem TSHR-immunisierten Tier (Titer $1 * 10^{10}$).

4.1 Auswirkung auf das Schilddrüsenvolumen

Die makroskopische Untersuchung ergab eine deutliche Vergrößerung der Schilddrüsen der TSHR-immunisierten Tiere. Abbildung 14 zeigt repräsentative Fotografien. Das Schilddrüsenvolumen betrug bei den hyperthyreoten Tieren durchschnittlich $11,17 \text{ mm}^3$ (Titer $1 * 10^{10}$) bzw. $9,41 \text{ mm}^3$ (Titer $1 * 10^{11}$), bei den euthyreoten, mock-immunisierten $3,4 \text{ mm}^3$ bzw. $3,65 \text{ mm}^3$ und bei den nativen Tieren durchschnittlich $2,59 \text{ mm}^3$ (s. Abbildung 15).

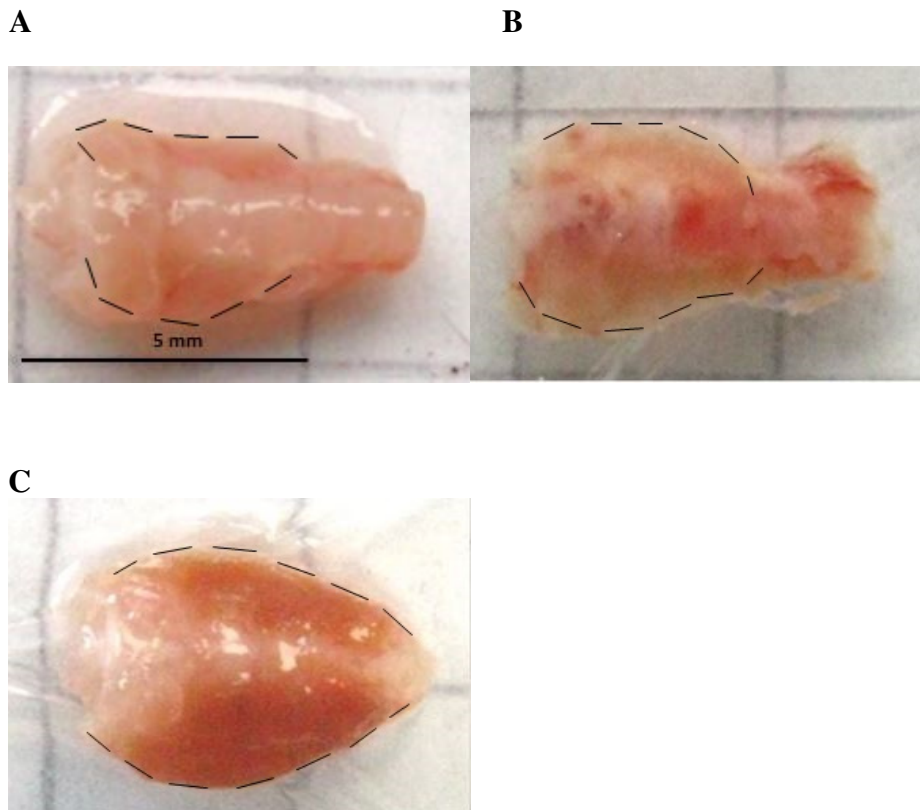


Abbildung 14: Vergleich der Schilddrüsengröße nach neun Immunisierungen

In Abb. A die Schilddrüse eines nativen Tieres, in Abb. B die einer Maus aus der mock-immunisierten Gruppe (Titer $1 * 10^{10}$) und Abb. C zeigt die Schilddrüse eines TSHR-immunisierten Tieres (Titer $1 * 10^{10}$).

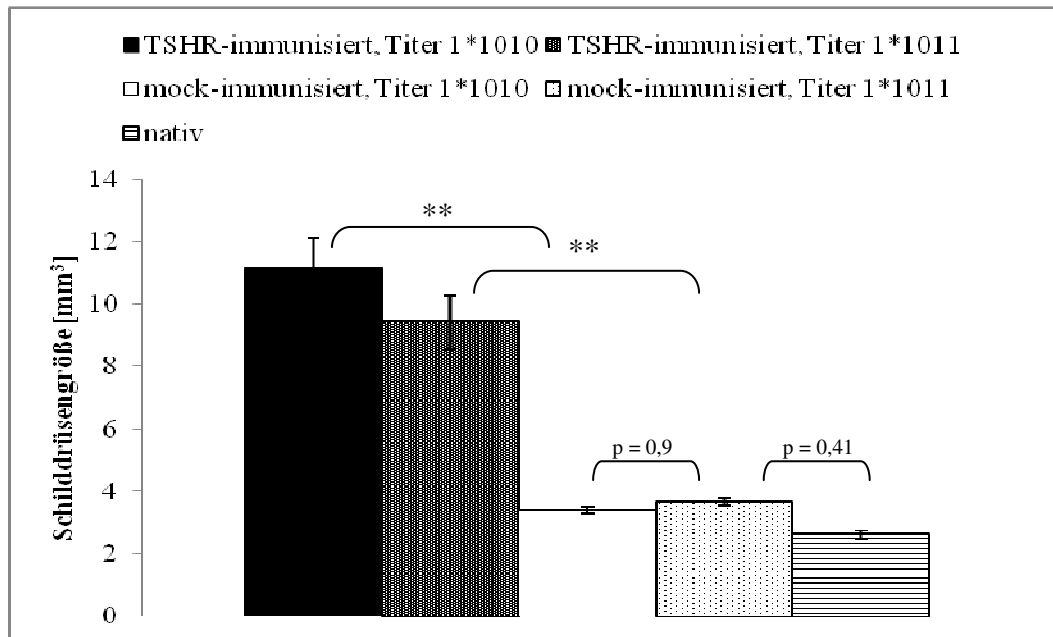


Abbildung 15: Schilddrüsenvolumen nach neun Immunisierungen

bei TSHR-immunisierten Tieren und mock-immunisierten Tieren, sowie den nicht immunisierten nativen Tieren. Dargestellt sind die Mittelwerte in $\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$. Die statistische Signifikanz beträgt $p < 0,001$ (dargestellt mit **) für die TSHR-immunisierten Tiere verglichen mit den mock-immunisierten Gruppen.

4.2 Auswirkung auf das Herzgewicht

Die histopathologische Untersuchung ergab ein Herzgewicht von durchschnittlich 0,13 g und 0,14 g bei den hyperthyreoten Tieren und 0,11 g bzw. 0,12 g bei den mock-immunisierten Gruppen. Das Herzgewicht der Nativtiere betrug durchschnittlich 0,09 g (s. Abb. 17). Sowohl die Unterschiede zwischen TSHR-immunisierten und mock-immunisierten Gruppen, als auch zwischen den mock-immunisierten und nativen Tieren waren signifikant ($p < 0,001$). Die Effektstärke liegt bei $d_{\text{Cohen}} = 1,3$ für den Unterschied zwischen TSHR-immunisiert versus mock-immunisiert und $d_{\text{Cohen}} = 2$ für den Effekt zwischen mock-immunisiert ($1 * 10^{10}$) und Nativgruppe. Qualitativ fiel eine deutliche Hypertrophie der Myokardzellen auf. Hinsichtlich der Kollagenmenge war kein Unterschied zwischen den Gruppen feststellbar. Abbildung 16 zeigt die deutliche Myokardhypertrophie und Volumenzunahme bei den TSHR-immunisierten Tieren im Vergleich zu den mock-immunisierten Mäusen.

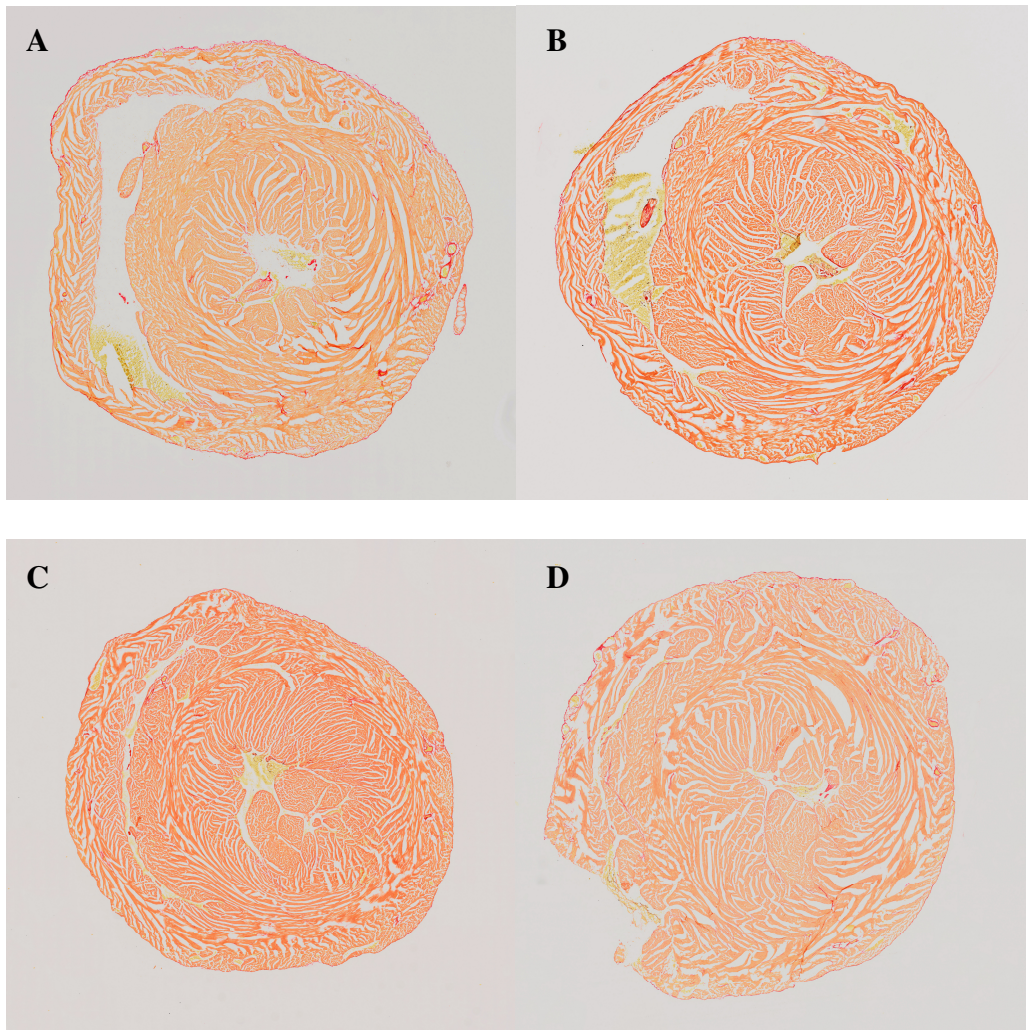


Abbildung 16: Histologie des Herzens

Abb. A zeigt den histologischen Schnitt des Herzens eines mock-immunisierten Tieres mit dem Virustiter 1×10^{10} , Abb. B den eines mock-immunisierten Tieres mit dem Titer 1×10^{11} . Darunter die Herzschnitte der TSHR-immunisierten Mäuse mit den Virustitern 1×10^{10} (Abb. C) und 1×10^{11} (Abb. D).

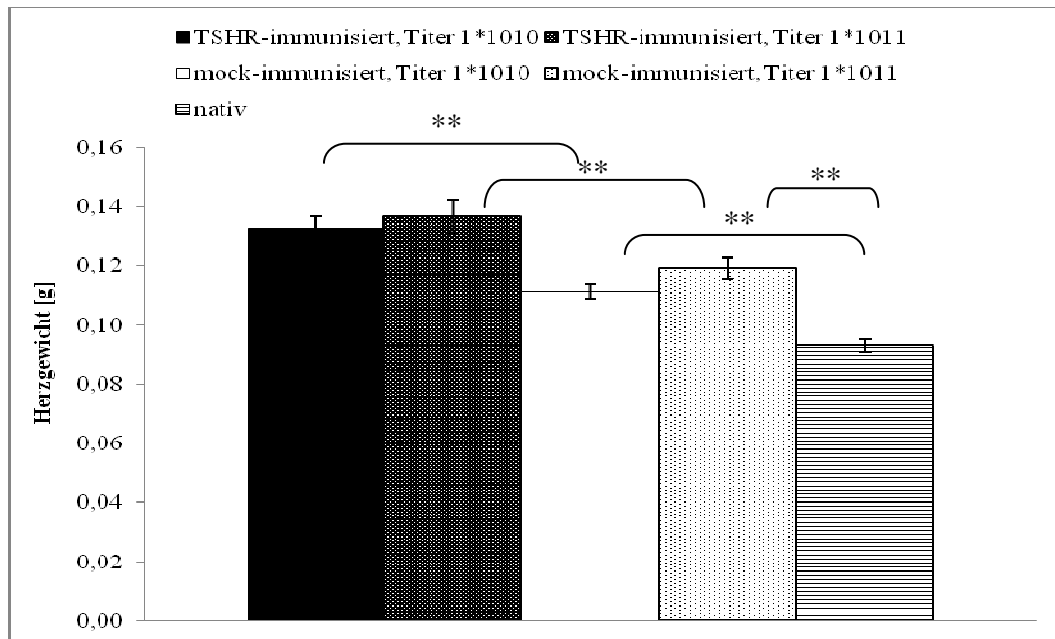


Abbildung 17: Vergleich des Herzgewichts nach neun Immunisierungen mit Ad-TSHR oder Ad-GFP, jeweils mit den Virustitern $1 \cdot 10^{10}$ und $1 \cdot 10^{11}$ und den nicht immunisierten nativen Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. ** $p < 0,001$ für die TSHR-immunisierten Gruppen verglichen mit den mock-immunisierten Tieren, sowie für die Nativgruppe verglichen mit den mock-immunisierten Gruppen.

5. Effekt der Immunisierung auf das Körpergewicht

Hinsichtlich der Gewichtsentwicklung war mittels T-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den vier immunisierten Gruppen zu ermitteln (s. Abbildung 18). Die TSHR-immunisierten Tiere zeigten einen Anstieg von durchschnittlich 7,7 bzw. 7,8 g. Dies entspricht einem prozentualen Anstieg von 45 bzw. 44 %. Die mock-immunisierten Gruppen nahmen 8,2 (Steigerung um 50 %) und 6,5 g (36 %) zum Ausgangswert zu. Die Nativtiere hingegen zeigten eine Steigerung des Körpergewichts um 5,8 g bzw. 34 %. Die Effektstärke für den Unterschied zwischen TSHR-immunisierten und mock-immunisierten Tieren (je mit dem Titer $1 \cdot 10^{10}$) beträgt $d_{\text{Cohen}} = 0,14$. Ein mittlerer Effekt besteht für die immunisierten Gruppen mit dem höheren Virustiter mit $d_{\text{Cohen}} = 0,7$.

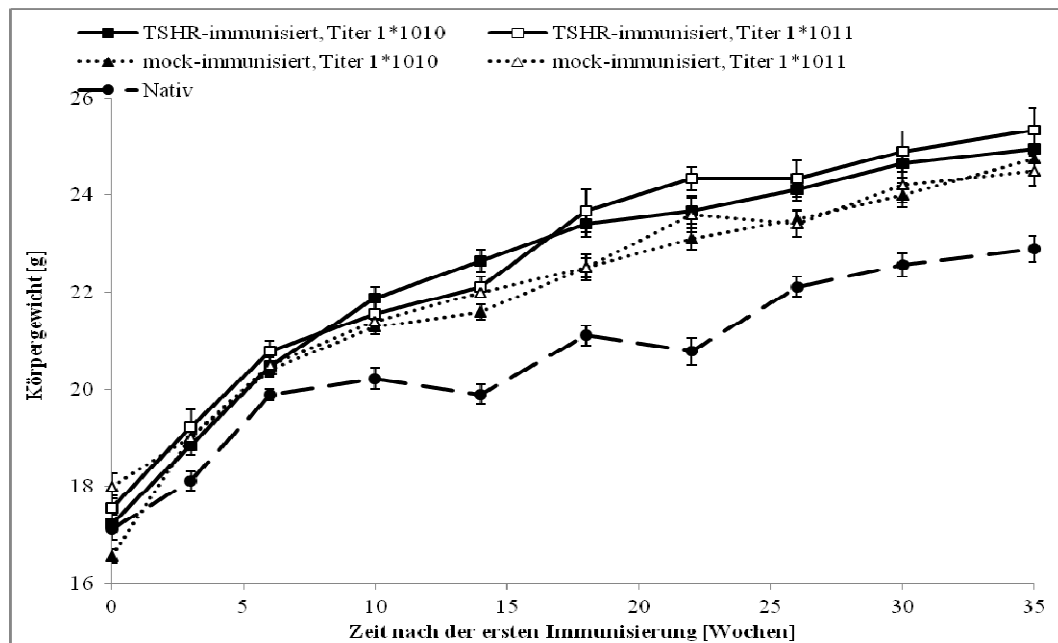


Abbildung 18: Gewichtsverlauf über 35 Wochen

Alle Mäuse waren zu Versuchsbeginn (Tag 0) sechs Wochen alt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

V. DISKUSSION

1. Material und Methoden

1.1 Wahl der Versuchstiere

Die Maus ist aufgrund ihrer geringen Größe und der damit verbundenen einfachen und kostengünstigen Haltung ein beliebtes Versuchstier. Im vorliegenden Modell zeichnet sie sich zudem dadurch aus, dass nahezu alle bisher beschriebenen Studien zu Morbus Basedow an der Maus durchgeführt wurden und dadurch eine sehr gute Vergleichbarkeit gegeben ist. Speziell die Immunisierungsprotokolle wurden an verschiedenen Mausstämmen getestet, sodass auf eine fundierte Datenlage für den Stamm BALB/c zurückgegriffen werden konnte. Dieser Mausstamm zeigt in verschiedenen Tiermodellen reproduzierbare Symptomausprägungen wie die Entwicklung von anti-TSHR-Antikörpern, erhöhte T_4 -Werte und histologische Veränderungen der Schilddrüse (NAGAYAMA et al., 2002; CHEN et al., 2003; KITA-FURUYAMA et al., 2003; SEETHARAMAIAH & LAND, 2006; ZHAO et al., 2011). Wang et al. veröffentlichten zwar auch vielversprechende Ergebnisse einer Studie mit Rhesusaffen (WANG et al., 2013), doch ist die Maus unter ethischen Aspekten und im Hinblick auf § 23 der Tierschutz-Versuchstierverordnung diesem Modell vorzuziehen.

Die Tiergruppe ist im beschriebenen Modell sehr homogen gewählt. Die Tiere haben nicht nur einen identischen genetischen Hintergrund, sondern sind auch im Hinblick auf Alter und Geschlecht einheitlich. Divergierende Untersuchungsergebnisse können also nicht auf biologische Unterschiede zurückgeführt werden. Das Alter der Tiere von sechs Wochen bei der ersten Immunisierung wurde aus dem Nagayama-Protokoll übernommen. Aber auch andere Studien verwendeten Mäuse im Alter von sechs bis sieben Wochen (SHIMOJO et al., 1996; KITA et al., 1999; PICHURIN et al., 2001; KITA-FURUYAMA et al., 2003; CHEN et al., 2004). Auch im Hinblick auf den Entwicklungsstatus des Immunsystems ist demnach eine gute Vergleichbarkeit zu den anderen Studien gewährleistet. Gleiches gilt für das Geschlecht. Hier kommen

auch praktische Gründe für die Tierhaltung hinzu, da weibliche Tiere in Gruppen gehalten werden können.

1.2 Wahl des Protokolls

Die Entscheidung für ein Protokoll mit Adenovirus-Immunisierung fiel aufgrund der guten Ergebnisse von Nagayama (NAGAYAMA et al., 2002) und Chen (CHEN et al., 2004), die weit größere Erkrankungsraten erzielen konnten als andere Modelle. Zudem ist der Aufwand verglichen mit Xenotransplantationen oder Splenozytentransfer gering und auch für das Tier stellen die Eingriffe der Immunisierungen und EKG in Narkose sowie regelmäßige Blutabnahmen vergleichsweise geringe Belastungen dar.

Obwohl in der Literatur bereits verschiedene Adenovirus-Protokolle beschrieben sind, fand bisher keine Langzeitbeobachtung statt, mit Ausnahme eines Modells bei dem der Antikörpertiter über insgesamt 20 Wochen nach dreimaliger Immunisierung gemessen wurde. In diesem Fall nahm die Fähigkeit der Antikörper, cAMP in Testzellen zu stimulieren, bei der letzten Messung deutlich ab. Darüber hinaus gab es einen Ansatz, der 24 Wochen nach der Immunisierung histologische Veränderungen an Schilddrüse und Orbita immunisierter TSHR-knock-out Mäuse beobachtete. Dennoch wurde dieses Modell als transient erachtet, da es nach 16-wöchiger Dauer eher zu Hypo- als zu Hyperthyreose führte (NAKAHARA et al., 2012). In dem hier beschriebenen neuen Ansatz, bei dem neun Immunisierungen über einen Zeitraum von neun Monaten appliziert wurden, waren durchgängig Symptome des M. Basedow, wie die Bildung von TSHR-Antikörpern, erhöhte T₄-Spiegel, Struma und Tachykardie nachweisbar. Exophthalmus, der zu der typischen Trias beim Menschen gehört wurde, wie in den meisten anderen Tiermodellen nicht beobachtet. Das verwendete Applikationsintervall findet Anlehnung an das Protokoll von Jahns et al., die ein Immunisierungsprotokoll für ein Rattenmodell für dilatative Kardiomyopathie entwickelten. Zwar wurden die Tiere hier über einen Zeitraum von 14 Monaten durch subkutane Injektion immunisiert, doch war ein Peak der Antikörperproduktion bereits nach acht Wochen messbar (JAHNS et al., 2004).

Zu beachten ist, dass nicht alle Mäuse eine Hyperthyreose nach Adenovirusimmunisierung entwickeln. Nagayama beschrieb Erkrankungsraten von bis zu 55 % (NAGAYAMA et al., 2002), Chen sogar bis 80 % (CHEN et al.,

2003). Ziel der vorliegenden Studie war zu zeigen, dass das Adenovirusprotokoll auch im Langzeitversuch funktioniert. Daher gingen nur hyperthyreote Tiere in die Untersuchung ein. Die in dieser Studie beobachteten Erkrankungsraten lagen wie bei Chen et al. bei ca. 80 %.

1.3 Wahl der Narkose

Für die Immunisierungen und die Messung der Herzfrequenz wurde eine Inhalationsnarkose mit Isofluran gewählt. Diese Narkoseform ist sehr gut steuerbar und die Tierbelastung verglichen mit einer Injektionsnarkose deutlich geringer. Roth et al. untersuchten den Einfluss verschiedener Anästhetika auf die Herzfrequenz der Maus und fanden die höchste Reproduzierbarkeit und die geringste depressive Wirkung bei Isoflurannarkosen (ROTH et al., 2002). Zudem handelte es sich in der vorliegenden Untersuchung nicht um schmerzhafte Eingriffe, die eine Narkoseform mit höherer analgetischer Wirkung erforderlich gemacht hätte. Obwohl Isofluran eine kompensatorische Tachykardie aufgrund einer peripheren Vasodilatation auslösen kann (ERHARDT et al., 2004), konnte für den Mausstamm BALB/c kein Einfluss auf die Herzfrequenz nachgewiesen werden (ZUURBIER et al., 2002).

2. Ergebnisse

2.1 Anti-TSHR-Antikörper

Stimulierende anti-TSHR-Antikörper konnten mit drei verschiedenen Methoden nachgewiesen werden, unter anderem mit einem Assay der dritten Generation, der als Goldstandard in der Humanmedizin gilt. Der Einsatz im Mausmodell ist neuartig, scheint aber als ergänzender Parameter Erfolg versprechend. Die Absolutwerte der hyperthyreoten Tiere bewegen sich im Bereich von 8 – 998 U/l (Mittelwert 184 U/l) und befinden sich damit in einer ähnlichen Größenordnung wie der an Morbus Basedow erkrankte Mensch (typischerweise zwischen 1,5 bis 100 U/l). Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu Untersuchungen in anderen Tiermodellen zu Autoimmunerkrankungen, bei denen Antikörpertiter im Tier um mehrere Zehnerpotenzen höher waren als im menschlichen Patienten (CHEN et al., 2003). Insofern kann die Verwendung des M22-basierten 3.-Generations-

Assay eine interessante Ergänzung zu früheren Studien darstellen. Zu beachten ist, dass alle Proben zwar mit dem gleichen ELISA gemessen wurden, jedoch zwei unterschiedliche Chargen zum Einsatz kamen. So wurden die Serumproben der Nativtiere und eines Teils der mock-immunisierten Mäuse (Titer $1 * 10^{10}$) mit einer anderen Charge gemessen als die übrigen Proben. Bei der Messung der Nativtiere (und teilweise der mock-immunisierten) ergab die mitgeführte Negativkontrolle einen Wert von ungefähr 10 U/l und auch die Untersuchung der Serumproben der nativen Tiere ergaben Werte in ähnlicher Größenordnung. Die mock-immunisierten Mäuse, deren Serum mit dem ELISA der ersten Charge untersucht wurde, hatten hingegen zu keinem Zeitpunkt messbare Antikörpertiter. Wahrscheinlich ist der Unterschied der Ergebnisse auf eine Änderung der Zusammensetzung des ELISA-Kits zurückzuführen. Nach Herstellerangaben sind Werte von $> 0,4$ U/l beim Menschen als positives Ergebnis zu werten. Für die Maus sind keine Referenzwerte bekannt. Würde man aber von einer ähnlichen Größenordnung ausgehen, hätten die nativen und mock-immunisierten Mäuse, die mit der zweiten Charge gemessen wurden, auch nachweisbare Antikörpertiter. Aufgrund der großen Diskrepanz zu den Ergebnissen der TSHR-immunisierten Tiere und der Verschiebung der Negativkontrolle ist dies allerdings als eher unwahrscheinlich anzusehen.

Die Ergebnisse der cAMP-Stimulation in Testzellen unterstützen die Ergebnisse des ELISAs der dritten Generation. Die Aktivität steigt bis zur 27. Woche an und fällt dann in der Messung in Woche 35 wieder leicht ab. Zu allen Messzeitpunkten liegt sie aber signifikant höher, als die cAMP-Aktivität der mock-immunisierten und nativen Tiere. Bei der Messung ergab sich allerdings die gleiche Schwierigkeit, wie beim 3. Generations-ELISA. Die Verwendung von zwei verschiedenen Populationen von CHO-Zellen führte zu Ungleichmäßigkeiten der Ergebnisse. Während die Serumproben der TSHR-immunisierten Tiere mit dem Titer $1 * 10^{11}$ und fünf Proben aus der Titergruppe $1 * 10^{10}$ zu sehr hohen Ergebnissen führten (um 80 pmol/ml im Mittel), lagen die restlichen 20 Proben aus der TSHR-immunisierten Gruppe $1 * 10^{10}$ deutlich darunter (um 16 pmol/ml). Dies führte zu einem Absinken der Mittelwerte der Titergruppe $1 * 10^{10}$, obwohl die tatsächliche cAMP-Aktivität möglicherweise höher gewesen wäre. Dennoch zeigt der deutliche Anstieg zur Basalmessung das Vorhandensein von TSHR-Antikörpern in beiden TSHR-immunisierten Gruppen.

Das Absinken der Antikörpertiter, das mit den beiden beschriebenen Verfahren gezeigt wurde, ist eventuell auf das Vorhandensein von anti-Adenovirus-Antikörpern zurückzuführen, die die Wirkung der Immunisierung zumindest teilweise neutralisieren könnten. Andere Autoren (WANG et al., 2013) testeten ihre Versuchstiere positiv auf diese Immunglobuline. Die Untersuchung erfolgte im beschriebenen Tiermodell jedoch nicht.

Zusätzlich zu den oben genannten Verfahren wurde bei einem Teil der Tiere (n = 44) eine Untersuchung auf Antikörper mit einem ELISA der zweiten Generation durchgeführt. Alle TSHR-immunisierten Mäuse zeigten hier eine TSH-Inhibition, jedoch keines der mock-immunisierten Tiere.

2.2 Thyroxin (T₄ gesamt)

Die gemessenen durchschnittlichen Thyroxinwerte liegen im unteren Bereich der bisher veröffentlichten Werte. Nagayama gab T₄-Serumspiegel von 9 – 20 µl/dl für hyperthyreote Mäuse an (NAGAYAMA et al., 2002), Kita 6,9 – 14,3 µl/dl (KITA et al., 1999) und Shimojo im Mittel $12,3 \pm 2,6$ µl/dl (SHIMOJO et al., 1996). Die in dieser Studie gemessenen maximalen T₄-Level liegen bei $10,86 \pm 1,64$ µl/dl bei den TSHR-immunisierten Mäusen (Titer $1 * 10^{10}$) bzw. $8,91 \pm 1,34$ µg/dl (Titer $1 * 10^{11}$). Die Titergruppe $1 * 10^{11}$ neigt, wie schon von Chen et al. beschrieben, zu einem Abfall (CHEN et al., 2003; CHEN et al., 2004). Der Thyroxinspiegel dieser Mäuse liegt bei den letzten Messungen sogar im gleichen Bereich wie die mock-immunisierten und nativen Tiere. Andere Autoren berichten von der hohen Variabilität dieses Wertes und der mangelnden Korrelation zu anderen Untersuchungsergebnissen (GILBERT et al., 2006; MOSHKELGOSHA et al., 2013). Dennoch zeigen die erstgenannten Autoren und auch die Ergebnisse der $1 * 10^{10}$ -Gruppe, dass auch bei der Maus ein relativ konstanter Anstieg des Schilddrüsenhormons zu verzeichnen ist. Als alleiniger Beweis für eine Hyperthyreose ist er vermutlich unzureichend. Im Zusammenhang mit anderen Untersuchungsergebnissen kann er aber durchaus wichtige Hinweise liefern.

2.3 Histologie

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung entsprechen den in der Literatur veröffentlichten Resultaten nach Adenovirus-Immunisierung. Wie schon von Nagayama (NAGAYAMA et al., 2002) beschrieben, fielen bei den Ad-TSHR-immunisierten Mäusen eine deutliche Einfaltung des Follikelepithels und eine Fraktionierung sowie Vakuolisierung der Kolloidmasse auf. Diese Befunde decken sich zudem mit denen der Morbus Basedow-Patienten. Eine lymphozytäre Infiltration wie sie beim Menschen in der Regel vorkommt, war nicht nachweisbar. Aber auch andere Tierstudien konnten dieses Symptom nur vereinzelt und in milder Form nachweisen (SHIMOJO et al., 1996). Außerdem fiel bei den TSHR-immunisierten Tieren ein deutlich basophiler gefärbtes Schnittbild verglichen mit den Kontrollgruppen auf. Dies kann auf eine Steigerung der Aktivität der Zellen mit einer gesteigerten Proteinbiosynthese hinweisen. Das in diesen Zellen vermehrt vorkommende endoplasmatische Retikulum färbt sich basophil an (LIEBICH, 2004). Zusätzlich färbt sich das in den Follikeln enthaltene Thyreoglobulin mit Dauer der Speicherung zunehmend basophil (DÄMMRICH, 1991).

Eine Zunahme der Schilddrüsengröße gehört ebenfalls zu den Charakteristika der humanen Erkrankung und konnte auch gezeigt werden. Bei den TSHR-immunisierten Gruppen waren signifikant vergrößerte Schilddrüsen im Vergleich mit den mock-immunisierten nachweisbar. Der Volumenunterschied zwischen TSHR- und mock-immunisierten Tieren beträgt 70 % bzw. 61 %. Innerhalb der Kontrollgruppen gab es leichte Volumenunterschiede zwischen den Gruppen. Das durchschnittliche Schilddrüsenvolumen der Nativgruppe war um 24 % geringer als bei den mock-immunisierten Tieren. Die Unterschiede waren allerdings statistisch nicht signifikant ($p = 0,41$ bzw. $p = 0,9$).

Der Effekt der Immunisierungen auf das Herz konnte ebenfalls im histologischen Schnittbild belegt werden. Eine Hypertrophie der Myozyten wurde zwar bisher noch nicht im Mausmodell beschrieben, ist aber aufgrund der erhöhten Belastung typisch bei der humanen Hyperthyreose. Die Herzgewichte waren außerdem bei den TSHR-immunisierten Tieren signifikant erhöht. Wie auch bei der Schilddrüsengröße gab es bei den mock-immunisierten Tieren im Vergleich zu der Nativgruppe einen Trend zu einer Vergrößerung des Herzens. Eine gewisse Reaktion scheint also auch das GFP-exprimierende Adenovirus hervorzurufen.

2.4 Herzfrequenz

Bemerkenswert sind zudem die in vivo messbaren kardiologischen Veränderungen. Die Sinustachykardie zählt zu den klassischen Symptomen des Morbus Basedow beim Menschen und wurde bisher für kein Mausmodell beschrieben. Das vorliegende Modell zeigt eine progressive Frequenzerhöhung bis etwa zur 18. Versuchswoche bei den TSHR-immunisierten Tieren. Auch die mock-immunisierten und nativen Mäuse zeigten eine leichte Erhöhung zum Ausgangswert, die jedoch zu allen Messzeitpunkten signifikant niedriger war als bei den hyperthyreoten Tieren. Auch der T₄-Wert stieg bei der vorletzten Messung leicht an, sodass möglicherweise das freie Thyroxin auch bei diesen Tieren einen Frequenzanstieg begünstigt hat. Allerdings beschrieben verschiedene Autoren bereits eine zunehmende Frequenz mit steigendem Alter der Tiere (CHU et al., 2001; XING et al., 2009), was auch hier einen Frequenzanstieg erklären könnte. Bei den mock-immunisierten Tieren, die zudem ein erhöhtes Herzgewicht gegenüber den nativen Tieren zeigten, ist außerdem eine Tachykardie aufgrund einer Myokardhypertrophie in Betracht zu ziehen, wie sie z. B. bei der Katze beschrieben ist (WARE, 2010). Die Frequenzen beider mock-immunisierten Gruppen sinken jedoch bei der letzten Messung auf das Niveau der Nativtiere ab. Dieser Umstand spricht eher gegen eine kompensatorische Tachykardie.

Die leichten Schwankungen der Herzfrequenz der Nativtiere sind möglicherweise auf den Umstand zurückzuführen, dass die neun nativen Mäuse in einer Gruppe gehalten wurden. Stress innerhalb der Tiergruppe wird sich also gleichermaßen auf alle Tiere ausgewirkt haben. Die mock-immunisierten Mäuse waren hingegen verteilt auf verschiedene Käfige. Der Verlauf der Herzfrequenz dieser beiden Gruppen ist wesentlicher gleichmäßiger.

Der basale Messwert liegt zwischen 387 bpm bei den Ad-TSHR-immunisierten Mäusen (Titer $1 \cdot 10^{10}$) und 440 bpm bei den nativen Tieren. Zuurbrier gibt für die narkotisierte BALB/c Maus eine Herzfrequenz von 434 bpm an, die allerdings zum Messzeitpunkt doppelt so alt (12 – 13 Wochen) waren wie die Mäuse dieser Studie (ZUURBIER et al., 2002). Das Narkoseregime wurde bei allen Tieren zu allen Zeitpunkten identisch gehalten, sodass auch dessen Einfluss auf die Herzfrequenz als identisch anzusehen ist. Es kann demnach ein systematischer Fehler vorliegen.

Das erhöhte Herzgewicht bei den TSHR-immunisierten Tieren und die Myokardhypertrophie belegen zusätzlich den Effekt des erhöhten Thyroxins im Serum auf die Herzleistung. Da insbesondere die kardialen Symptome zu einer Zunahme der Morbidität und Mortalität beim Menschen führen (KLEIN & OJAMAA, 2001), ist eine Abbildung dieser Symptome im Tierversuch interessant und relevant für künftige Therapiestudien. Zudem könnten weitere EKG-Untersuchungen mit hochwertigeren Geräten zusätzliche Aussagen über das Vorhandensein von weiteren kardialen Symptomen wie Vorhofflimmern zulassen. Solche Rückschlüsse waren aufgrund der Qualität der Aufzeichnung in dieser Studie leider nicht möglich.

2.5 Körpergewicht

Eine Reduzierung des Körpergewichts, wie sie in anderen Tierstudien nachgewiesen wurde (KITA et al., 1999; WANG et al., 2013) und beim Menschen aufgrund der erhöhten Stoffwechselrate auftreten kann, konnte in diesem Modell nicht gezeigt werden. Zu bedenken ist, dass eine Arbeitsgruppe, die einen Gewichtsverlust zeigen konnte diesen in Zusammenhang mit einer Hyperaktivität gesehen hat und eine weitere Studie nicht mit Mäusen, sondern mit Rhesusaffen gearbeitet hat. Eine Steigerung der Aktivität konnte im vorliegenden Modell nicht beobachtet werden. Im Modell von Nagayama mussten zwei weibliche Mäuse vom Stamm BALB/c und eine vom Stamm C57BL/6 aufgrund starken Gewichtsverlustes euthanasiert werden. Auffälligkeiten im Verhalten der Tiere wurden auch in diesem Fall nicht berichtet und die anderen Tiere waren unauffällig (NAGAYAMA et al., 2002). Warum die induzierte autoimmune Hyperthyreose nur bei Einzeltieren zu Gewichtsverlust führt bleibt unklar.

Die geringere Gewichtszunahme in der Gruppe der Nativtiere kann auf eine temporäre Änderung der Umwelteinflüsse zurückzuführen sein. Wie auch bei der Herzfrequenz kommt es um den 98. Versuchstag zu einem Absinken der Werte. Ursache kann beispielsweise eine subklinische Infektion oder eine unbemerkte, vorübergehende Änderung von Stallparametern (z. B. Veränderung der Zu-/Abluft in diesem Käfig) sein. Die Verzögerung der Gewichtsentwicklung in Woche 14 konnte anschließend nicht mehr aufgeholt werden, sodass diese Tiere auch am Ende der Studie noch im Rückstand waren.

2.6 Einfluss des Virustiters

In Anlehnung an bestehende Adenovirus-Protokolle (NAGAYAMA et al., 2002; CHEN et al., 2004; MCLACHLAN et al., 2012b) wurden die Mausgruppen entweder mit dem Virustiter $1 * 10^{10}$ oder $1 * 10^{11}$ immunisiert. Hinsichtlich der Herzfrequenz und des Gewichtsverlaufs der Tiere konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Titern festgestellt werden. Bei den T_4 -Messungen jedoch fällt der Hormonspiegel bei den Mäusen, die mit dem Virustiter $1 * 10^{11}$ immunisiert wurden, ab Woche 23 auf das Level der mock-immunisierten und nativen Tiere ab. Auch bei den TSHR-Antikörpermessungen und der Schilddrüsengröße zeigt diese Gruppe eine geringere Differenz zu den Kontrollgruppen als die Ad-TSHR-Gruppe mit dem Titer $1 * 10^{10}$. Lediglich die cAMP-Aktivität ist in der Gruppe $1 * 10^{11}$ höher als die in der Gruppe mit dem niedrigeren Titer. Wie bereits diskutiert, kann dies aber mit einer unterschiedlichen Qualität der verwendeten CHO-Zellen zusammenhängen. Nagayama immunisierte ausschließlich mit dem Virustiter $1 * 10^{11}$ und erreichte dennoch wesentlich höhere T_4 -Level als in dieser Studie. Allerdings muss beachtet werden, dass die Nagayama-Studie über einen wesentlichen kürzeren Zeitraum dauerte und auch in dieser Studie die T_4 - und Antikörpertiter zunächst anstiegen. Möglicherweise sind mit diesem Titer aufgrund einer stärkeren Immunreaktion und der Ausbildung von anti-Adenovirus-Antikörpern keine stabilen Ergebnisse zu erreichen.

Auch die mock-immunisierten Tiere wurden mit zwei verschiedenen Viruskonzentrationen immunisiert. Bei diesen Mausgruppen waren die Unterschiede zwischen den Virustitern jedoch deutlich geringer. Lediglich bei der Herzfrequenz stiegen die Tiere, die das Ad-GFP-Virus in der Konzentration $1 * 10^{11}$ erhielten zwischen der 18. und 26. Versuchswoche stärker an. Ob dies auf eine stärkere Immunreaktion zurückzuführen oder ein Zufallsbefund ist, müsste an einer größeren Tiergruppe überprüft werden. Insgesamt aber zeigen die Untersuchungsergebnisse, die insbesondere hinsichtlich der Antikörperentwicklung und der T_4 -Werte kaum von denen der Nativtiere abweichen, dass eine Immunisierung mit Ad-GFP-Virus als Kontrollgruppe geeignet ist. Zwar zeigen die mock-immunisierten Gruppen höhere Herzgewichte und Schilddrüsengrößen als die nativen Tiere, der Unterschied zu den TSHR-immunisierten Mäusen war aber stets signifikant. Die Veränderungen der mock-

immunisierten Tiere waren zudem rein morphologischer Natur, aber nicht funktional.

Weitere Studien müssten zeigen, ob eine Veränderung der Morphologie dem Adenovirus zu schulden ist oder dem Grün-fluoreszierenden Protein. Die Autoren Nagayama und Chen verwendeten als Kontrolle ein Adenovirus, das β -Galaktosidase exprimiert. In beiden Studien gab es allerdings keine native Kontrollgruppe, die einen Unterschied zur Kontrollgruppe hätte aufzeigen können. Beide Autoren berichteten zwar von einer Vergrößerung der Schilddrüse bei den TSHR-immunisierten Tieren, aber gaben keine Gewichte oder Längenmaße an, die mit den Ergebnissen der Nativtiere dieser Studie zu vergleichen wären.

In einer Untersuchung zur therapeutischen Wirkung von Calmodulin-Antisense bei Myokardhypertrophie wurden Adenoviren als Vektoren für dieses RNA-Konstrukt verwendet. Die Autoren infizierten Kardiomyozyten neonataler Ratten mit den Viren. Als Kontrolle diente, wie in dieser Studie ein GFP-exprimierendes Adenovirus. Nach Stimulation mit Phenylephrin oder Angiotensin wurde eine Reduzierung der Hypertrophie durch das antisensetragende Adenovirus im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (ARRUDA et al., 2007). Wie auch bei den erwähnten Hyperthyreosemodellen wurde keine zusätzliche Nativgruppe mitgeführt. Eine hypertrophe Wirkung des Adenovirus an sich, hätte vermutlich nicht zu solch signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen geführt. Ob das GFP die Hypertrophie durch Phenylephrin zusätzlich fördert oder begünstigt, wurde nicht näher untersucht. GFP wurde auch in zahlreichen anderen Studien verwendet. Eine Herzhypertrophie oder sonstige Organvergrößerungen sind in der verfügbaren Literatur bisher nicht beschrieben. Eine Abklärung, ob das Protein zu Volumenzunahmen von Zellen und Geweben führt, wäre nicht nur relevant für Tiermodelle, sondern auch für die in-vitro-Forschung.

2.7 Andere mögliche Messparameter

Aufgrund der begrenzten zur Verfügung stehenden Serummenge, musste eine Auswahl an durchzuführenden Untersuchungen getroffen werden. Da anti-TSHR-Antikörper das entscheidende Kriterium bei der Diagnose des Morbus Basedow darstellen, wurde wie bereits diskutiert, besonderes Augenmerk auf deren

Nachweis gelegt. In anderen Veröffentlichungen entschieden sich die Autoren für eine andere Auswahl an Parametern, zum Beispiel die Messung von Trijodthyronin (T_3) im Shimojo-Modell (SHIMOJO et al., 1996). Aufgrund der Varianz der Messergebnisse bei der Maus (DAVIES, 1995), wurde in dieser Studie von dieser Messung abgesehen.

Wie bereits erwähnt, wurden in der Primatenstudie von Wang et al. die Versuchstiere neben TRAK auch auf anti-Adenovirus-Antikörper (WANG et al., 2013). Obwohl diese Untersuchung in dieser Studie nicht durchgeführt wurde, können die absinkenden TSHR-Antikörpertiter zum Ende der Studie auch hier hinweisend auf die Entwicklung von anti-Adenovirus-Antikörper sein. Wie groß dieser Einfluss ist, ist jedoch fraglich. Vor allem die histologischen Ergebnisse zeigen, dass auch nach neun Monaten noch ein stabiler Morbus Basedow-Phänotyp nachweisbar ist.

Eine Untersuchung der Augen und des retrobulbären Gewebes wie von einigen Arbeitsgruppen vorgenommen (NAGAYAMA et al., 2002; ZHAO et al., 2011; MOSHKELGOSHA et al., 2013), wurde nicht durchgeführt. Phänotypisch wurde kein Exophtalmus beobachtet. Ob histologisch Hinweise auf eine endokrine Orbitopathie im Langzeit-Modell vorhanden sind, kann die Fragestellung weiterer Studien sein.

Eine sonographische Untersuchung der Schilddrüse in vivo wäre eine nicht-invasive Möglichkeit morphologische Ähnlichkeiten zur veränderten Schilddrüse des Menschen aufzuzeigen und gleichzeitig den Verlauf der Gewebeveränderung darzustellen. Mancini et al. führte Ultraschalluntersuchungen an der Schilddrüse der Maus durch und fand bezüglich der Erfassung von Schilddrüsenknoten eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 60 %. Die Klassifikation dieser Veränderungen konnte mit einer Sensitivität von 91 % und Spezifität von 83 % durchgeführt werden (MANCINI et al., 2009). Aufgrund der Genauigkeit der Untersuchungsmethode, könnte die Sonographie auch im vorliegenden Modell eine sinnvolle Ergänzung zur Histologie darstellen.

2.8 Schlussbetrachtung

Frühere Studien beschreiben eine Vielzahl an Möglichkeiten, vorübergehend Symptome des Morbus Basedow im Tiermodell darzustellen. Die

Vergleichbarkeit der einzelnen Projekte wird erschwert durch unterschiedliche Rahmenbedingungen und die Ausbildung verschiedener Symptomkomplexe. Insbesondere die histologischen Veränderungen und die Ergebnisse der Serumuntersuchungen variierten in den einzelnen Modellen. Erhöhte T₄ Spiegel, der Nachweis von stimulierenden anti-TSHR-Antikörpern, eine Vergrößerung der Schilddrüse sowie typische histologische Veränderungen, wie kubisches Follikelepithel und Vakuolisierung werden als essentielle Charakteristika für ein funktionierendes Tiermodell erachtet (MCLACHLAN et al., 2005). Alle vier Eigenschaften konnten im vorliegenden Modell für den Virustiter $1 * 10^{10}$ gezeigt werden. Hinzu kommen die kardiologischen Veränderungen, die bisher noch nicht für das Mausmodell beschrieben waren. Die dargestellten Ergebnisse können als Ausgangslage für weitere verifizierende Studien dienen. Insbesondere die Antikörperbestimmungen könnten durch Messungen mit einheitlichen Chargen konkretisiert werden. Nachfolgende Untersuchungen können sowohl die Therapieentwicklung unterstützen, als auch zum tieferen Verständnis der Pathogenese beitragen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war, ein Mausmodell für Morbus Basedow zu entwickeln, das eine konstante Symptomausprägung über mehrere Monate gewährleistet. Hintergrund ist die Annahme, dass eine mögliche Therapieentwicklung nur an einem verlässlichen Tiermodell realisierbar und sinnvoll ist. Die in-vivo-Parameter Herzfrequenz und Gewichtsentwicklung sollten hinsichtlich ihrer Aussagekraft zum Krankheitsverlauf überprüft werden.

Hierfür wurde eine Mausgruppe vom Stamm BALB/c über neun Monate mit einem TSHR-exprimierenden Adenovirus neunmal immunisiert. Einer Kontrollgruppe wurde ein Adenovirus verabreicht, das GFP exprimiert („mock-Immunisierung“). Beide Adenoviren wurden sowohl in der Konzentration $1 * 10^{10}$ und $1 * 10^{11}$ verabreicht. Zusätzlich fanden Blut- und EKG-Untersuchungen bei einer nativen, nicht-immunisierten Mausgruppe statt. Vor jeder Immunisierung wurden Körpergewicht und Herzfrequenz der Tiere dokumentiert. Das Blutserum der Mäuse wurde auf TSHR-stimulierende Antikörper mit zwei verschiedenen ELISA sowie mit der Bestimmung von cAMP in Testzellen untersucht. Eine Messung von Thyroxin fand zu vier Zeitpunkten statt. Am Versuchsende wurden die Schilddrüsen und Herzen bezüglich ihrer Größe untersucht und histologische Schnitte der Schilddrüse begutachtet.

Nur bei den Ad-TSHR-immunisierten Tieren konnten steigende Antikörpertiter mit den genannten Verfahren nachgewiesen werden. Der aus der Humanmedizin übernommene Assay der dritten Generation lieferte dabei auch bei der Maus zuverlässige Ergebnisse. Auch zeigten diese Tiere eine Erhöhung des T_4 -Wertes verglichen mit den Kontrollgruppen. Der Parameter Herzfrequenz erwies sich als guter Indikator für den Verlauf der Krankheit. Wie der Antikörpertiter stieg auch die Herzfrequenz bei den Ad-TSHR-immunisierten Mäusen deutlich an. Eine Beobachtung der Gewichtsentwicklung eignete sich hingegen nicht für eine Beurteilung des Krankheitsverlaufs. Zudem waren bei den Ad-TSHR-immunisierten Tieren typische histologische Veränderungen, wie eine Hyperplasie und Faltung des Follikel epithels und eine deutliche Vakuolisierung der Follikel nachweisbar. Hinsichtlich der Viruskonzentration war mit dem Titer $1 * 10^{10}$ konstantere Ergebnisse zu erzielen als mit $1 * 10^{11}$, insbesondere bei den

Parametern T₄-Erhöhung im Serum und Schilddrüsenvergrößerung. Die mock-immunisierten und die nativen Kontrolltiere entwickelte weder TSHR-Antikörper, noch eine signifikante Tachykardie. Der histologische Befund dieser Tiere war unauffällig.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Langzeit-Immunisierung über neun Monate mit TSHR-exprimierendem Adenovirus in der Konzentration $1 \cdot 10^{10}$ eine Aufrechterhaltung von Morbus Basedow Symptomen über mindestens 30 Wochen gewährleistet und damit einen wichtigen Beitrag in der präklinischen Forschung leisten kann. Bestehende Adenovirusprotokolle können somit für einen deutlich längeren Zeitraum als bisher bekannt, validiert werden. Die Messung des Verlaufs der Herzfrequenz stellt zudem eine sinnvolle Ergänzung zu bestehenden Mausmodellen dar.

VII. SUMMARY

The objective of this thesis was the development of a mouse model for human Graves' disease which ensures constant symptoms over a period of several months. Background is the assumption that a possible therapeutic development is only feasible and sensible on reliable animal models. The in-vivo parameters heart rate and weight development should therefore be reviewed as to their significance on the progression of the disease.

In this study, BALB/c mice were immunized nine times with a TSHR-expressing adenovirus over a period of nine months. Alternatively, mice were administered adenovirus which expressed GFP ("mock-immunization"). Both adenoviruses were given at concentrations of 1×10^{10} and 1×10^{11} . Additionally, blood and ECG tests took place on a naïve, unimmunized mouse group. Before each immunization, body weight and heart rate of the animals were documented. The blood sera of the mice were examined for TSHR-stimulating antibodies with two different ELISA as well as determination of cAMP in test cells. A measurement of thyroxin took place at four time points (trial weeks 0, 8, 27 and 35). At the end of the test, the thyroid glands and hearts were investigated with regard to their dimensions and histological sections were examined.

Increasing antibody titers were evidenced only in the Ad-TSHR-immunized animals. The mouse "third generation" assay which was adopted from a respective human assay delivered reliable results. Also these animals showed an increase of T_4 levels compared to the control groups. The parameter heart rate proved to be a good indicator of the course of the disease. The heart rates of the Ad-TSHR-immunized mice increased considerably as well as the antibody titers. Observing the weight trend was unsuitable for the disease course assessment. However, the histological examination showed considerable differences between both groups. In Ad-TSHR-immunized animals, typical changes were verified, such as hyperplasia and a folding of the follicular epithelium and a marked vacuolization of the follicles. With the titer 1×10^{10} more stable results could be achieved than with 1×10^{11} , especially on the parameters increase in serum T_4 and the enlargement of the thyroid gland. The histological result of these animals was inconspicuous.

In summary, a long-term immunization over a nine month period with TSHR-expressing adenovirus used at concentrations of $1 * 10^{10}$ and $1 * 10^{11}$ ensures maintenance of Graves' disease symptoms for a period of at least 30 weeks and can provide an important contribution in preclinical research. Existing adenovirus protocols could therefore be validated for a considerably longer timeframe than was previously known. The measurement of the heart frequency represents a useful addition to existing mouse models.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

ABRAHAM-NORDLING, M., BYSTROM, K., TORRING, O., LANTZ, M., BERG, G., CALISSENDORFF, J., NYSTROM, H.F., JANSSON, S., JORNESKOG, G., KARLSSON, F.A., NYSTROM, E., OHRLING, H., ORN, T., HALLENGREN, B., WALLIN, G. (2011): Incidence of hyperthyroidism in Sweden. *Eur J Endocrinol*; 165: 899-905.

ADAMS, D., PURVES, H.D. (1956): Abnormal responses in the assay for thyrotropin. *Proceedings of the University Otago Medical School*; 34: 11-12.

ALLANNIC, H., FAUCHET, R., ORGIAZZI, J., MADEC, A.M., GENETET, B., LORCY, Y., LE GUERRIER, A.M., DELAMBRE, C., DERENNES, V. (1990): Antithyroid drugs and Graves' disease: a prospective randomized evaluation of the efficacy of treatment duration. *J Clin Endocrinol Metab*; 70: 675-679.

ALLEN, E.M., APPEL, M.C., BRAVERMAN, L.E. (1986): The effect of iodide ingestion on the development of spontaneous lymphocytic thyroiditis in the diabetes-prone BB/W rat. *Endocrinology*; 118: 1977-1981.

ALNAQDY, A., AL-MASKARI, M. (2005): Determination of the levels of anti-thyroid-stimulating hormone receptor antibody with thyroid peroxidase antibody in Omani patients with Graves' disease. *Med Princ Pract*; 14: 209-212.

ANDERSON, C.K., MILLER, O.F., 3rd. (2003): Triad of exophthalmos, pretibial myxedema, and acropachy in a patient with Graves' disease. *J Am Acad Dermatol*; 48: 970-972.

ANDO, T., IMAIZUMI, M., GRAVES, P., UNGER, P., DAVIES, T.F. (2003): Induction of thyroid-stimulating hormone receptor autoimmunity in hamsters. *Endocrinology*; 144: 671-680.

ANISZEWSKI, J.P., VALYASEVI, R.W., BAHN, R.S. (2000): Relationship between disease duration and predominant orbital T cell subset in Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab*; 85: 776-780.

ARRUDA, L.H., CESTARI, I.A., LEIRNER, A.A., CESTARI, I.N. (2007): Adenoviral Expression of Calmodulin Antisense Reduces Hypertrophy in Cultured Cardiomyocytes. *Artificial Organs*; 31: 274-277.

BAHN, R.S., BURCH, H.B., COOPER, D.S., GARBER, J.R., GREENLEE, M.C., KLEIN, I., LAURBERG, P., MCDOUGALL, I.R., MONTORI, V.M., RIVKEES, S.A., ROSS, D.S., SOSA, J.A., STAN, M.N. (2011): Hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis: management guidelines of the American Thyroid Association and American Association of Clinical Endocrinologists. *Endocr Pract*; 17: 456-520.

BIRNBAUMER, L., ABRAMOWITZ, J., BROWN, A.M. (1990): Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*; 1031: 163-224.

BRALEY-MULLEN, H., SHARP, G.C., MEDLING, B., TANG, H. (1999): Spontaneous autoimmune thyroiditis in NOD.H-2h4 mice. *J Autoimmun*; 12: 157-165.

BRIX, T.H., CHRISTENSEN, K., HOLM, N.V., HARVALD, B., HEGEDUS, L. (1998): A population-based study of Graves' disease in Danish twins. *Clin Endocrinol (Oxf)*; 48: 397-400.

BUCKLAND, P.R., HOWELLS, R.D., RICKARDS, C.R., REES SMITH, B. (1985): Affinity-labelling of the thyrotropin receptor. Characterization of the photoactive ligand. *Biochem J*; 225: 753-760.

CASTAGNONE, D., RIVOLTA, R., RESCALLI, S., BALDINI, M.I., TOZZI, R., CANTALAMESSA, L. (1996): Color Doppler sonography in Graves' disease: value in assessing activity of disease and predicting outcome. *AJR Am J Roentgenol*; 166: 203-207.

CHEN, C.R., PICHURIN, P., NAGAYAMA, Y., LATROFA, F., RAPOPORT, B., MCLACHLAN, S.M. (2003): The thyrotropin receptor autoantigen in Graves disease is the culprit as well as the victim. *J Clin Invest*; 111: 1897-1904.

CHEN, C.R., PICHURIN, P., CHAZENBALK, G.D., ALIESKY, H., NAGAYAMA, Y., MCLACHLAN, S.M., RAPOPORT, B. (2004): Low-dose immunization with adenovirus expressing the thyroid-stimulating hormone receptor A-subunit deviates the antibody response toward that of autoantibodies in human Graves' disease. *Endocrinology*; 145: 228-233.

CHEN, F., DAY, S.L., METCALFE, R.A., SETHI, G., KAPEMBWA, M.S., BROOK, M.G., CHURCHILL, D., DE RUITER, A., ROBINSON, S., LACEY, C.J., WEETMAN, A.P. (2005): Characteristics of autoimmune thyroid disease occurring as a late complication of immune reconstitution in patients with advanced human immunodeficiency virus (HIV) disease. *Medicine (Baltimore)*; 84: 98-106.

CHU, V., OTERO, J.M., LOPEZ, O., MORGAN, J.P., AMENDE, I., HAMPTON, T.G. (2001): Method for non-invasively recording electrocardiograms in conscious mice. *BMC Physiol*; 1: 6.

COSTAGLIOLA, S., RODIEN, P., MANY, M.C., LUDGATE, M., VASSART, G. (1998): Genetic immunization against the human thyrotropin receptor causes thyroiditis and allows production of monoclonal antibodies recognizing the native receptor. *J Immunol*; 160: 1458-1465.

CRISANTI, P., OMRI, B., HUGHES, E., MEDURI, G., HERY, C., CLAUSER, E., JACQUEMIN, C., SAUNIER, B. (2001): The expression of thyrotropin receptor in the brain. *Endocrinology*; 142: 812-822.

DÄMMRICH, K. (1991): Endokrine Organe. In: Pathologie der Haustiere: Organveränderungen : mit 37 Tabellen. Teil 1. Schulz, L.C., ed.: Fischer; 809.

DAUMERIE, C., LUDGATE, M., COSTAGLIOLA, S., MANY, M.C. (2002): Evidence for thyrotropin receptor immunoreactivity in pretibial connective tissue from patients with thyroid-associated dermopathy. *Eur J Endocrinol*; 146: 35-38.

DAVIES, T.F., SMITH, B.R., HALL, R. (1978): Binding of thyroid stimulators to guinea pig testis and thyroid. *Endocrinology*; 103: 6-10.

DAVIES, T.F. (1995): Modeling Graves' disease in the mouse--work still in progress. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*; 80: 2846-2847.

DECHAIRO, B.M., ZABANEH, D., COLLINS, J., BRAND, O., DAWSON, G.J., GREEN, A.P., MACKAY, I., FRANKLYN, J.A., CONNELL, J.M., WASS, J.A., WIERSINGA, W.M., HEGEDUS, L., BRIX, T., ROBINSON, B.G., HUNT, P.J., WEETMAN, A.P., CAREY, A.H., GOUGH, S.C. (2005): Association of the TSHR gene with Graves' disease: the first disease specific locus. *Eur J Hum Genet*; 13: 1223-1230.

DESAI, K.H., SATO, R., SCHAUBLE, E., BARSH, G.S., KOBILKA, B.K., BERNSTEIN, D. (1997): Cardiovascular indexes in the mouse at rest and with exercise: new tools to study models of cardiac disease. *Am J Physiol*; 272: H1053-1061.

DRVOTA, V., JANSON, A., NORMAN, C., SYLVEN, C., HAGGBLAD, J., BRONNEGARD, M., MARCUS, C. (1995): Evidence for the presence of functional thyrotropin receptor in cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun*; 211: 426-431.

DUBRAY LA PERLE, K., JORDAN, C. (2012): Endocrine System. In: Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas. Treuting, P.M., Dintzis, S.M., Frevert, C.W., Montine, K.S., eds.: Elsevier/Academic Press; 211-217.

ENDO, T., OHMORI, M., IKEDA, M., ANZAI, E., ONAYA, T. (1992): Heterogeneous responses of recombinant human thyrotropin receptor to immunoglobulins from patients with Graves' disease. *Biochem Biophys Res Commun*; 186: 1391-1396.

ERHARDT, W., HENKE, J., KROKER, R. (2004): Pharmaka im Rahmen der Anästhesie und der perioperativen Schmerzklinderung. In: *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heintier sowie bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. Erhardt, W., Henke, J., Haberstroh, J., eds.: Schattauer; 84.

FATOURECHI, V., BARTLEY, G.B., EGHBALI-FATOURECHI, G.Z., POWELL, C.C., AHMED, D.D., GARRITY, J.A. (2003): Graves' dermopathy and acropachy are markers of severe Graves' ophthalmopathy. *Thyroid*; 13: 1141-1144.

FATOURECHI, V. (2005): Pretibial myxedema: pathophysiology and treatment options. *Am J Clin Dermatol*; 6: 295-309.

FELDKAMP, J. (2002): Epidemiologie von Autoimmunthyreopathien. In: *Schilddrüse 2001: Schilddrüse und Autoimmunität*. Henning-Symposium, 15. Konferenz über die Menschliche Schilddrüse. Mann, K., Weinheimer, B., Janßen, O.E., eds.: De Gruyter; 70.

GANDHI, M., NIKIFOROV, Y.E. (2011): Suitability of animal models for studying radiation-induced thyroid cancer in humans: evidence from nuclear architecture. *Thyroid*; 21: 1331-1337.

GARCIA-MAYOR, R.V., PARAMO, C., LUNA CANO, R., PEREZ MENDEZ, L.F., GALOFRE, J.C., ANDRADE, A. (1992): Antithyroid drug and Graves' hyperthyroidism. Significance of treatment duration and TRAb determination on lasting remission. *J Endocrinol Invest*; 15: 815-820.

GEBERT, G., THOMAS, C. (1996): Endokrine Organe. In: *Spezielle Pathologie*. Thomas, C., ed.: Schattauer; 302.

GILBERT, J.A., GIANOUKAKIS, A.G., SALEHI, S., MOORHEAD, J., RAO, P.V., KHAN, M.Z., MCGREGOR, A.M., SMITH, T.J., BANGA, J.P. (2006): Monoclonal pathogenic antibodies to the thyroid-stimulating hormone receptor in Graves' disease with potent thyroid-stimulating activity but differential blocking activity activate multiple signaling pathways. *J Immunol*; 176: 5084-5092.

GOSSELIN, S.J., CAPEN, C.C., MARTIN, S.L., TARGOWSKI, S.P. (1980): Biochemical and immunological investigations on hypothyroidism in dogs. *Can J Comp Med*; 44: 158-168.

GRUBECK-LOEBENSTEIN, B., TRIEB, K., SZTANKAY, A., HOLTER, W., ANDERL, H., WICK, G. (1994): Retrobulbar T cells from patients with Graves' ophthalmopathy are CD8+ and specifically recognize autologous fibroblasts. *J Clin Invest*; 93: 2738-2743.

GUO, Y., WU, W.J., QIU, Y., TANG, X.L., YANG, Z., BOLLI, R. (1998): Demonstration of an early and a late phase of ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol*; 275: H1375-1387.

HAINES, D.M., LORDING, P.M., PENHALE, W.J. (1984): Survey of thyroglobulin autoantibodies in dogs. *Am J Vet Res*; 45: 1493-1497.

HEUFELDER, A., HOFBAUER, L. (2007): Klinische Symptomatik. In: *Praxis der Viszeralchirurgie: Endokrine Chirurgie*. Siewert, J.R., Rothmund, M., Schumpelick, V., eds.: Springer; 93.

HEUFELDER, A.E., BAHN, R.S. (1992): Evidence for the presence of a functional TSH-receptor in retroocular fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy. *Exp Clin Endocrinol*; 100: 62-67.

HOLM, I.A., MANSON, J.E., MICHELS, K.B., ALEXANDER, E.K., WILLETT, W.C., UTIGER, R.D. (2005): Smoking and other lifestyle factors and the risk of Graves' hyperthyroidism. *Arch Intern Med*; 165: 1606-1611.

HÖRMANN, R. (2005): Erkrankungen der Schilddrüse. In: Schilddrüsenerkrankungen: Leitfaden für Praxis und Klinik: ABW, Wiss.-Verlag; 41.

JAHNS, R., BOIVIN, V., HEIN, L., TRIEBEL, S., ANGERMANN, C.E., ERTL, G., LOHSE, M.J. (2004): Direct evidence for a beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*; 113: 1419-1429.

JANSON, A., RAWET, H., PERBECK, L., MARCUS, C. (1998): Presence of Thyrotropin Receptor in Infant Adipocytes. *Pediatr Res*; 43: 555-558.

JONG, W.M., ZUURBIER, C.J., DE WINTER, R.J., VAN DEN HEUVEL, D.A., REITSMA, P.H., TEN CATE, H., INCE, C. (2002): Fentanyl-fluanisone-midazolam combination results in more stable hemodynamics than does urethane alpha-chloralose and 2,2,2-tribromoethanol in mice. *Contemp Top Lab Anim Sci*; 41: 28-32.

KAGUELIDOU, F., ALBERTI, C., CASTANET, M., GUITTENY, M.A., CZERNICHOW, P., LEGER, J. (2008): Predictors of autoimmune hyperthyroidism relapse in children after discontinuation of antithyroid drug treatment. *J Clin Endocrinol Metab*; 93: 3817-3826.

KAMIJO, K., ISHIKAWA, K., TANAKA, M. (2005): Clinical evaluation of 3rd generation assay for thyrotropin receptor antibodies: the M22-biotin-based ELISA initiated by Smith. *Endocr J*; 52: 525-529.

KARASEK, M., LEWINSKI, A. (2003): Etiopathogenesis of Graves' disease. *Neuro Endocrinol Lett*; 24: 161-166.

KENNEDY, R.L., THODAY, K.L. (1988): Autoantibodies in feline hyperthyroidism. *Res Vet Sci*; 45: 300-306.

KITA-FURUYAMA, M., NAGAYAMA, Y., PICHURIN, P., MCLACHLAN, S.M., RAPOPORT, B., EGUCHI, K. (2003): Dendritic cells infected with adenovirus expressing the thyrotrophin receptor induce Graves' hyperthyroidism in BALB/c mice. *Clin Exp Immunol*; 131: 234-240.

KITA, M., AHMAD, L., MARIANS, R.C., VLASE, H., UNGER, P., GRAVES, P.N., DAVIES, T.F. (1999): Regulation and transfer of a murine model of thyrotrophin receptor antibody mediated Graves' disease. *Endocrinology*; 140: 1392-1398.

KLEIN, I., OJAMAA, K. (2001): Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med*; 344: 501-509.

KRISS, J.P., PLESHAKOV, V., CHIEN, J.R. (1964): Isolation and Identification of the Long-Acting Thyroid Stimulator and Its Relation to Hyperthyroidism and Circumscribed Pretibial Myxedema. *J Clin Endocrinol Metab*; 24: 1005-1028.

LAURBERG, P., PEDERSEN, K.M., VESTERGAARD, H., SIGURDSSON, G. (1991): High incidence of multinodular toxic goitre in the elderly population in a low iodine intake area vs. high incidence of Graves' disease in the young in a high iodine intake area: comparative surveys of thyrotoxicosis epidemiology in East-Jutland Denmark and Iceland. *J Intern Med*; 229: 415-420.

LEGER, J., KAGUELIDOU, F., ALBERTI, C., CAREL, J.C. (2014): Graves' disease in children. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*; 28: 233-243.

LEVY, B.M., HAMPTON, S., DREIZEN, S., HAMPTON, J.K., Jr. (1972): Thyroiditis in the marmoset (*Callithrix* spp. and *Saguinus* spp.). *J Comp Pathol*; 82: 99-103.

LIEBICH, H.G. (2004): Stoffwechselsysteme der Zelle. In: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Liebich, H.G., ed.: Schattauer; 15-16.

MANCINI, M., VERGARA, E., SALVATORE, G., GRECO, A., TRONCONE, G., AFFUSO, A., LIUZZI, R., SALERNO, P., SCOTTO DI SANTOLO, M., SANTORO, M., BRUNETTI, A., SALVATORE, M. (2009): Morphological ultrasound microimaging of thyroid in living mice. *Endocrinology*; 150: 4810-4815.

MANGKLABRUKS, A., COX, N., DEGROOT, L.J. (1991): Genetic factors in autoimmune thyroid disease analyzed by restriction fragment length polymorphisms of candidate genes. *J Clin Endocrinol Metab*; 73: 236-244.

MCLACHLAN, S.M., NAGAYAMA, Y., RAPOPORT, B. (2005): Insight into Graves' hyperthyroidism from animal models. *Endocr Rev*; 26: 800-832.

MCLACHLAN, S.M., ALPI, K., RAPOPORT, B. (2011): Review and hypothesis: does Graves' disease develop in non-human great apes? *Thyroid*; 21: 1359-1366.

MCLACHLAN, S.M., ALIESKY, H.A., CHEN, C.R., CHONG, G., RAPOPORT, B. (2012a): Breaking tolerance in transgenic mice expressing the human TSH receptor A-subunit: thyroiditis, epitope spreading and adjuvant as a 'double edged sword'. *PLoS One*; 7: e43517.

MCLACHLAN, S.M., ALIESKY, H.A., CHEN, C.R., RAPOPORT, B. (2012b): Role of self-tolerance and chronic stimulation in the long-term persistence of adenovirus-induced thyrotropin receptor antibodies in wild-type and transgenic mice. *Thyroid*; 22: 931-937.

MISHARIN, A., HEWISON, M., CHEN, C.R., LAGISHETTY, V., ALIESKY, H.A., MIZUTORI, Y., RAPOPORT, B., MCLACHLAN, S.M. (2009): Vitamin D deficiency modulates Graves' hyperthyroidism induced in BALB/c mice by thyrotropin receptor immunization. *Endocrinology*; 150: 1051-1060.

MISRAHI, M., LOOSFELT, H., ATGER, M., SAR, S., GUIOCHON-MANTEL, A., MILGROM, E. (1990): Cloning, sequencing and expression of human TSH receptor. *Biochem Biophys Res Commun*; 166: 394-403.

MOHLIN, E., FILIPSSON NYSTROM, H., ELIASSON, M. (2014): Long-term prognosis after medical treatment of Graves' disease in a northern Swedish population 2000-2010. *Eur J Endocrinol*; 170: 419-427.

MORITA, T., YOSHIKAWA, N., AKASU, F., RESETKOVA, E., ARREAZA, G., MILLER, N., JAMIESON, C., VOLPE, R. (1993): Studies of thyroid xenografts from Graves' disease in severe combined immunodeficient mice. *J Clin Endocrinol Metab*; 77: 255-261.

MOSHKELGOSHA, S., SO, P.W., DEASY, N., DIAZ-CANO, S., BANGA, J.P. (2013): Cutting edge: retrobulbar inflammation, adipogenesis, and acute orbital congestion in a preclinical female mouse model of Graves' orbitopathy induced by thyrotropin receptor plasmid-in vivo electroporation. *Endocrinology*; 154: 3008-3015.

MOSMANN, T.R., COFFMAN, R.L. (1989): TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*; 7: 145-173.

MULLINS, R.J., COHEN, S.B., WEBB, L.M., CHERNAJOVSKY, Y., DAYAN, C.M., LONDEI, M., FELDMANN, M. (1995): Identification of thyroid stimulating hormone receptor-specific T cells in Graves' disease thyroid using autoantigen-transfected Epstein-Barr virus-transformed B cell lines. *J Clin Invest*; 96: 30-37.

NAGAYAMA, Y. (1994): [Domain structure and signal transduction mechanisms in the thyrotropin receptor]. *Nihon Rinsho*; 52: 979-983.

NAGAYAMA, Y., TAKESHITA, A., LUO, W., ASHIZAWA, K., YOKOYAMA, N., NAGATAKI, S. (1994): High affinity binding of thyrotropin

(TSH) and thyroid-stimulating autoantibody for the TSH receptor extracellular domain. *Thyroid*; 4: 155-159.

NAGAYAMA, Y., KITA-FURUYAMA, M., ANDO, T., NAKAO, K., MIZUGUCHI, H., HAYAKAWA, T., EGUCHI, K., NIWA, M. (2002): A novel murine model of Graves' hyperthyroidism with intramuscular injection of adenovirus expressing the thyrotropin receptor. *J Immunol*; 168: 2789-2794.

NAKAGAWA, S., CUTHILL, I.C. (2007): Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. *Biol Rev Camb Philos Soc*; 82: 591-605.

NAKAHARA, M., JOHNSON, K., ECKSTEIN, A., TAGUCHI, R., YAMADA, M., ABIRU, N., NAGAYAMA, Y. (2012): Adoptive transfer of antithyrotropin receptor (TSHR) autoimmunity from TSHR knockout mice to athymic nude mice. *Endocrinology*; 153: 2034-2042.

NGUYEN, L.Q., ARSEVEN, O.K., GERBER, H., STEIN, B.S., JAMESON, J.L., KOPP, P. (2002): Cloning of the cat TSH receptor and evidence against an autoimmune etiology of feline hyperthyroidism. *Endocrinology*; 143: 395-402.

NOVACK, D.V. (2003): TSH, the bone suppressing hormone. *Cell*; 115: 129-130.

NUNEZ MIGUEL, R., SANDERS, J., CHIRGADZE, D.Y., FURMANIAK, J., REES SMITH, B. (2009): Thyroid stimulating autoantibody M22 mimics TSH binding to the TSH receptor leucine rich domain: a comparative structural study of protein-protein interactions. *J Mol Endocrinol*; 42: 381-395.

PICHURIN, P., YAN, X.M., FARILLA, L., GUO, J., CHAZENBALK, G.D., RAPOPORT, B., MCLACHLAN, S.M. (2001): Naked TSH receptor DNA vaccination: A TH1 T cell response in which interferon-gamma production, rather than antibody, dominates the immune response in mice. *Endocrinology*; 142: 3530-3536.

PRUMMEL, M.F., WIERSINGA, W.M. (1993): Smoking and risk of Graves' disease. *Jama*; 269: 479-482.

RALLS, P.W., MAYEKAWA, D.S., LEE, K.P., COLLETTI, P.M., RADIN, D.R., BOSWELL, W.D., HALLS, J.M. (1988): Color-flow Doppler sonography in Graves disease: "thyroid inferno". *AJR Am J Roentgenol*; 150: 781-784.

RAPOPORT, B., MCLACHLAN, S.M. (2001): Thyroid autoimmunity. *J Clin Invest*; 108: 1253-1259.

ROSE, N.R., WITEBSKY, E. (1956): Studies on organ specificity. V. Changes in the thyroid glands of rabbits following active immunization with rabbit thyroid extracts. *J Immunol*; 76: 417-427.

ROTH, D.M., SWANEY, J.S., DALTON, N.D., GILPIN, E.A., ROSS, J., Jr. (2002): Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 282: H2134-2140.

ROTONDI, M., CAPPELLI, C., PIRALI, B., PIROLA, I., MAGRI, F., FONTE, R., CASTELLANO, M., ROSEI, E.A., CHIOVATO, L. (2008): The effect of pregnancy on subsequent relapse from Graves' disease after a successful course of antithyroid drug therapy. *J Clin Endocrinol Metab*; 93: 3985-3988.

SANDERS, J., EVANS, M., PREMAWARDHANA, L., DEPRAETERE, H., JEFFREYS, J., RICHARDS, T., FURMANIAK, J., SMITH, B.R. (2003): Human monoclonal thyroid stimulating autoantibody. *The Lancet*; 362: 126-128.

SANDERS, J., JEFFREYS, J., DEPRAETERE, H., EVANS, M., RICHARDS, T., KIDDIE, A., BRERETON, K., PREMAWARDHANA, L.D., CHIRGADZE, D.Y., NUNEZ MIGUEL, R., BLUNDELL, T.L., FURMANIAK, J., REES SMITH, B. (2004): Characteristics of a human monoclonal autoantibody to the thyrotropin receptor: sequence structure and function. *Thyroid*; 14: 560-570.

SAPIN, R., D'HERBOMEZ, M., GASSER, F., MEYER, L., SCHLIENGER, J.L. (2003): Increased sensitivity of a new assay for anti-thyroglobulin antibody detection in patients with autoimmune thyroid disease. *Clin Biochem*; 36: 611-616.

SCHMID, K. (2013): Pathologie der benignen Schilddrüsenerkrankungen. In: *Praxis Der Viszeralchirurgie: Endokrine Chirurgie*. Siewert, J.R., Rothmund, M., Schumpelick, V., eds.: Springer; 49.

SCHNEIDER, H. (1989): Hyperthyreose bei einem männlichen Flachlandgorilla. In: *Erkrankungen der Zootiere: Verhandlungsbericht des 31. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere vom 24. Mai bis 28. Mai 1989 in Dortmund*. Ippen, R., Schröder, H.D., eds.: Akademie-Verlag; 243-244.

SEETHARAMAIAH, G.S., LAND, K.J. (2006): Differential Susceptibility of BALB/c and BALB/cBy mice to Graves' hyperthyroidism. *Thyroid*; 16: 651-658.

SELLITTI, D.F., AKAMIZU, T., DOI, S.Q., KIM, G.H., KARIYIL, J.T., KOPCHIK, J.J., KOSHIYAMA, H. (2000): Renal expression of two 'thyroid-specific' genes: thyrotropin receptor and thyroglobulin. *Exp Nephrol*; 8: 235-243.

SHENKMAN, L., BOTTONE, E.J. (1976): Antibodies to *Yersinia enterocolitica* in thyroid disease. *Ann Intern Med*; 85: 735-739.

SHIMOJO, N., KOHNO, Y., YAMAGUCHI, K., KIKUOKA, S., HOSHIOKA, A., NIIMI, H., HIRAI, A., TAMURA, Y., SAITO, Y., KOHN, L.D., TAHARA, K. (1996): Induction of Graves-like disease in mice by immunization with fibroblasts transfected with the thyrotropin receptor and a class II molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 93: 11074-11079.

SOLIMAN, M., KAPLAN, E., STRAUS, F., FISFALEN, M.E., HIDAKA, Y., GUIMARAES, V., DEGROOT, L.J. (1995): Graves' disease in severe combined immunodeficient mice. *J Clin Endocrinol Metab*; 80: 2848-2855.

TOMER, Y., CONCEPCION, E., GREENBERG, D.A. (2002): A C/T single-nucleotide polymorphism in the region of the CD40 gene is associated with Graves' disease. *Thyroid*; 12: 1129-1135.

TOZZOLI, R., BAGNASCO, M., GIAVARINA, D., BIZZARO, N. (2012): TSH receptor autoantibody immunoassay in patients with Graves' disease: improvement of diagnostic accuracy over different generations of methods. Systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev*; 12: 107-113.

VALENTE, W.A., VITTI, P., YAVIN, Z., YAVIN, E., ROTELLA, C.M., GROLLMAN, E.F., TOCCAFONDI, R.S., KOHN, L.D. (1982): Monoclonal antibodies to the thyrotropin receptor: stimulating and blocking antibodies derived from the lymphocytes of patients with Graves disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 79: 6680-6684.

VANDERPUMP, M.P., TUNBRIDGE, W.M., FRENCH, J.M., APPLETON, D., BATES, D., CLARK, F., GRIMLEY EVANS, J., HASAN, D.M., RODGERS, H., TUNBRIDGE, F., ET AL. (1995): The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Wickham Survey. *Clin Endocrinol (Oxf)*; 43: 55-68.

VELAGA, M.R., WILSON, V., JENNINGS, C.E., OWEN, C.J., HERINGTON, S., DONALDSON, P.T., BALL, S.G., JAMES, R.A., QUINTON, R., PERROS, P., PEARCE, S.H. (2004): The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab*; 89: 5862-5865.

WANG, Y., WU, L.P., FU, J., LV, H.J., GUAN, X.Y., XU, L., CHEN, P., GAO, C.Q., HOU, P., JI, M.J., SHI, B.Y. (2013): Hyperthyroid monkeys: a nonhuman primate model of experimental Graves' disease. *J Endocrinol*; 219: 183-193.

WARE, W.A. (2010): Myocarderkrankungen der Katze. In: *Innere Medizin der Kleintiere*. Nelson, R.W., Couto, C.G., eds.: Elsevier GmbH, München; 152.

WARTOFSKY, L., GLINOER, D., SOLOMON, B., NAGATAKI, S., LAGASSE, R., NAGAYAMA, Y., IZUMI, M. (1991): Differences and similarities in the diagnosis and treatment of Graves' disease in Europe, Japan, and the United States. *Thyroid*; 1: 129-135.

WEETMAN, A.P., MCGREGOR, A.M. (1994): Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocr Rev*; 15: 788-830.

WINSA, B., ADAMI, H.O., BERGSTROM, R., GAMSTEDT, A., DAHLBERG, P.A., ADAMSON, U., JANSSON, R., KARLSSON, A. (1991): Stressful life events and Graves' disease. *Lancet*; 338: 1475-1479.

WITEBSKY, E., KITE, J.H., Jr., WICK, G., COLE, R.K. (1969): Spontaneous thyroiditis in the obese strain of chickens. I. Demonstration of circulating autoantibodies. *J Immunol*; 103: 708-715.

WONG, V., FU, A.X.-L., GEORGE, J., CHEUNG, N.W. (2002): Thyrotoxicosis induced by alpha-interferon therapy in chronic viral hepatitis. *Clin Endocrinol (Oxf)*; 56: 793-798.

XING, S., TSAIH, S.W., YUAN, R., SVENSON, K.L., JORGENSEN, L.M., SO, M., PAIGEN, B.J., KORSTANJE, R. (2009): Genetic influence on electrocardiogram time intervals and heart rate in aging mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 296: H1907-1913.

YAMAGUCHI, K., SHIMOJO, N., KIKUOKA, S., HOSHIOKA, A., HIRAI, A., TAHARA, K., KOHN, L.D., KOHNO, Y., NIIMI, H. (1997): Genetic control of anti-thyrotropin receptor antibody generation in H-2K mice immunized with thyrotropin receptor-transfected fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab*; 82: 4266-4269.

YANAGAWA, T., MANGKLABRUKS, A., CHANG, Y.B., OKAMOTO, Y., FISFALEN, M.E., CURRAN, P.G., DEGROOT, L.J. (1993): Human histocompatibility leukocyte antigen-DQA1*0501 allele associated with genetic

susceptibility to Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab*; 76: 1569-1574.

YANAGAWA, T., HIDAKA, Y., GUIMARAES, V., SOLIMAN, M., DEGROOT, L.J. (1995): CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab*; 80: 41-45.

YOSHIKAWA, N., NISHIKAWA, M., MORI, S., TOKORO, T., YAMAMOTO, Y., IKEHARA, S., KUMAZAWA, H., YAMASHITA, T., INADA, M. (1997): Simultaneous xenotransplantation of human Graves' thyroid tissue and autologous bone marrow cells in severe combined immunodeficient mice: successful reconstitution of human Graves' hyperthyroidism. *Eur J Endocrinol*; 136: 213-222.

ZHAO, S.X., TSUI, S., CHEUNG, A., DOUGLAS, R.S., SMITH, T.J., BANGA, J.P. (2011): Orbital fibrosis in a mouse model of Graves' disease induced by genetic immunization of thyrotropin receptor cDNA. *J Endocrinol*; 210: 369-377.

ZUURBIER, C.J., EMONS, V.M., INCE, C. (2002): Hemodynamics of anesthetized ventilated mouse models: aspects of anesthetics, fluid support, and strain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 282: H2099-2105.

IX. ANHANG

1. Ergebnisse der TSHR-Antikörpermessungen

Tabelle 1: Ergebnisse des ELISA der 2. Generation mit Mittelwerten, SD und SEM

Woche			35
Maus #	Virus	Titer	Inhibition %
2911	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	83,12
2912	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	68,80
3030	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	71,03
3032	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	72,43
3000	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	57,30
Mittelwert			70,54
n			5
SD			9,23
SEM			4,13

2922	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	67,15
2939	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	79,82
3087	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	78,79
3088	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	79,58
3035	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	80,32
3005	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	78,81
3006	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	60,37
3026	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	80,94
3027	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	53,28
Mittelwert			73,23
n			9
SD			10,34
SEM			3,45

2862	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-14,21
2863	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-4,47
2864	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-15,73
2865	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-12,81
2866	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-10,71
2904	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-10,56
2905	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-17,16
2906	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-12,64

Woche			35
Maus #	Virus	Titer	Inhibition %
2907	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-12,13
2908	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-17,22
2914	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-16,47
2915	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-15,37
2916	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-14,52
2917	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-13,38
2918	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-16,41
2934	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-22,63
2935	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-9,74
2936	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-13,31
2937	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-21,44
2938	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	-22,45
Mittelwert			-14,67
n			20
SD			4,41
SEM			0,99

2995	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	-1,35
2996	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	-10,35
2997	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	8,13
2998	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	5,67
2999	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	-0,46
3015	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	0,66
3016	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	1,67
3017	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	-10,88
3018	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	-18,65
3019	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	-18,55
Mittelwert			-4,41
n			10
SD			9,58
SEM			3,03

Tabelle 2: Ergebnisse des ELISAs der 3. Generation (Angaben in U/I) mit Mittelwerten, SD und SEM

Maus #	Virus	Titer	1. Messung Woche 8	2. Messung Woche 8	Mittelwert Woche 8	1. Messung Woche 23	2. Messung Woche 23	Mittelwert Woche 23	1. Messung Woche 35	2. Messung Woche 35	Mittelwert Woche 35
2911	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	49,78	124,64	87,21	123,73	998,23	560,98	136,14	198,50	167,32
2912	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	35,33		35,33	152,95	587,99	370,47	104,31	144,03	124,17
3030	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	74,61	271,93	173,27	190,37	623,60	406,99	80,58	145,49	113,03
3032	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	60,55	285,18	172,86	33,39	62,92	48,16	23,05	524,52	273,79
3000	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	42,26	116,97	79,62	40,99	104,11	72,55	32,99	71,88	52,44
4007	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	93,36	181,11	137,23	373,61	580,39	477,00	326,87	421,28	374,07
4022	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	45,24	63,88	54,56	160,28	193,99	177,14	77,39	83,88	80,63
4034	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	61,18	154,31	107,74	312,34	395,71	354,02	221,59	327,42	274,51
4044	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	39,34	106,89	73,12	211,70	307,28	259,49	110,67	85,19	97,93
4090	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	63,94	166,13	115,04	354,91	282,18	318,55	268,75	204,46	236,61
4103	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	46,93	0,00	23,46	320,20	221,32	270,76	303,20	235,26	269,23
4110	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	28,22	27,07	27,65	131,04	102,59	116,81	159,62	107,77	133,70
4111	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	62,03	62,89	62,46	204,60	125,70	165,15	66,72	69,71	68,21
4117	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	82,87	80,03	81,45	67,72	56,05	61,88	67,54	56,70	62,12

Maus #	Virus	Titer	1. Messung Woche 8	2. Messung Woche 8	Mittelwert Woche 8	1. Messung Woche 23	2. Messung Woche 23	Mittelwert Woche 23	1. Messung Woche 35	2. Messung Woche 35	Mittelwert Woche 35
4120	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	133,63	114,27	123,95	445,60	453,45	449,52	384,58	356,56	370,57
4123	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	61,46	42,08	51,77	288,42	227,64	258,03	231,95	258,96	245,45
4127	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	142,83	140,93	141,88	520,96	415,47	468,22	506,47	568,25	537,36
4135	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	32,23	26,01	29,12	351,12	231,41	291,26	256,51	190,38	223,45
4146	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	121,92	99,92	110,92	224,67	202,70	213,68	245,27	266,59	255,93
4173	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	91,24	68,25	79,75	160,05	172,89	166,47	112,05	194,37	153,21
4185	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	48,66	31,48	40,07	186,55	167,95	177,25	90,32	103,75	97,03
4197	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	39,33	33,13	36,23	146,01	231,68	188,84	65,68	108,09	86,88
4212	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	183,90	158,41	171,16	269,08	448,80	358,94	385,25	448,21	416,73
4213	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	91,45	64,11	77,78	57,21	73,95	65,58	60,22	79,02	69,62
4214	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	48,78	38,90	43,84	132,18	183,47	157,83	216,05	221,61	218,83
Mittelwert					85,50			258,22			200,11
n					25			25			25
SD					47,46			144,41			127,08
SEM					9,49			28,88			25,42
2922	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	156,225	15,8796	86,05	260,87	700,27	480,57	261,48	661,95	461,71
2939	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	41,55	121,763	81,66	59,66	358,18	208,92	119,54	397,74	258,64
3087	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	44,199	8,49	26,34	29,56	106,73	68,14	16,09	160,10	88,10
3088	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	107,842	421,68	264,76	183,58	402,98	293,28	84,24	152,20	118,22
3035	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	31,601	90,5	61,05	40,78	282,95	161,87	31,55	96,24	63,89

Maus #	Virus	Titer	1. Messung Woche 8	2. Messung Woche 8	Mittelwert Woche 8	1. Messung Woche 23	2. Messung Woche 23	Mittelwert Woche 23	1. Messung Woche 35	2. Messung Woche 35	Mittelwert Woche 35
3005	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	300,552	24,1307	162,34						
3006	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	48,262	103,054	75,66	30,58	153,32	91,95	34,11	66,56	50,34
3026	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	71,263	172,353	121,81	352,32	363,75	358,03	234,50		234,50
3027	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	136,539	821,264	478,90	221,48	665,37	443,43	154,63	46,95	100,79
Mittelwert					150,95			263,27			172,02
n					9			8			8
SD					141,32			155,94			139,82
SEM					47,11			55,13			49,43

[illegible]

Maus #	Virus	Titer	1. Messung Woche 8	2. Messung Woche 8	Mittelwert Woche 8	1. Messung Woche 23	2. Messung Woche 23	Mittelwert Woche 23	1. Messung Woche 35	2. Messung Woche 35	Mittelwert Woche 35
2916	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2917	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2918	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2934	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2935	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2936	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2937	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2938	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4018	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	7,63	12,06	9,85	8,90	16,86	12,88
4030	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	10,34	21,14	15,74	9,72	11,44	10,58
4042	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	10,07	22,73	16,40	10,17	10,09	10,13
4054	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	8,28	12,64	10,46	10,47	17,36	13,92
4099	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	9,62	0,00	4,81	11,41	0,00	5,71
4109	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	7,13	13,37	10,25	8,46	15,26	11,86
4119	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	9,67	3,03	6,35	9,07	15,41	12,24
4129	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	9,34	7,34	8,34	9,84	19,10	14,47
4139	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	7,75	13,16	10,45	9,54	21,43	15,49
4149	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	5,30	6,68	5,99	4,43	7,85	6,14
4174	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	8,94	10,26	9,60	9,29	11,01	10,15
4186	GFP	1*10 ¹⁰	0,00	0,00	0,00	7,82	8,14	7,98	7,71	7,15	7,43
Mittelwert					0,00			3,63			4,09

Maus #	Virus	Titer	1. Messung Woche 8	2. Messung Woche 8	Mittelwert Woche 8	1. Messung Woche 23	2. Messung Woche 23	Mittelwert Woche 23	1. Messung Woche 35	2. Messung Woche 35	Mittelwert Woche 35
n					32			32			32
SD					0,00			5,21			5,70
SEM					0,00			0,92			1,01
2995	GFP	1*10 ¹¹	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2996	GFP	1*10 ¹¹	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2997	GFP	1*10 ¹¹	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,11	1,11	1,11
2998	GFP	1*10 ¹¹	0,00	0,00	0,00	1,85	1,85	1,85	2,44	2,44	2,44
2999	GFP	1*10 ¹¹	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3015	GFP	1*10 ¹¹	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3016	GFP	1*10 ¹¹	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3017	GFP	1*10 ¹¹	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3018	GFP	1*10 ¹¹	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3019	GFP	1*10 ¹¹	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mittelwert					0,00			0,18			0,35
n					10			10			10
SD					0,00			0,58			0,81
SEM					0,00			0,18			0,26
4223	nativ		6,65	2,44	4,54	7,62	6,25	6,93	8,90	7,20	8,05
4224	nativ		3,77	3,15	3,46	7,05	6,87	6,96	7,90	6,91	7,41
4225	nativ		5,24	3,35	4,29	9,77	8,18	8,97	7,42	3,90	5,66

Maus #	Virus	Titer	1. Messung Woche 8	2. Messung Woche 8	Mittelwert Woche 8	1. Messung Woche 23	2. Messung Woche 23	Mittelwert Woche 23	1. Messung Woche 35	2. Messung Woche 35	Mittelwert Woche 35
4226	nativ		2,81	4,68	3,74	8,64	5,48	7,06	6,78	4,76	5,77
4227	nativ		5,47	4,58	5,02	7,51	5,99	6,75	9,87	8,16	9,01
4228	nativ		5,48	5,93	5,70	10,65	21,51	16,08	11,58	19,03	15,31
4229	nativ		2,92	1,29	2,10	10,85	20,40	15,63	9,78	11,23	10,50
4231	nativ		0,00	0,00	0,00	10,95	8,86	9,90	12,81	5,25	9,03
4232	nativ		0,00	0,00	0,00	12,78	6,40	9,59	12,45	5,49	8,97
Mittelwert					3,21			9,76			8,86
n					9			9			9
SD					2,08			3,66			2,89
SEM					0,69			1,22			0,96

Tabelle 3: Ergebnisse der cAMP-Messungen (Angaben in pmol/ml) mit Mittelwerten, SD und SEM

Maus #	Virus	Titer	1. Messung Tag 0	2. Messung Tag 0	Mittelwert Tag 0	1. Messung Woche 8	2. Messung Woche 8	Mittelwert Woche 8	1. Messung Woche 27	2. Messung Woche 27	Mittelwert Woche 27	1. Messung Woche 35	2. Messung Woche 35	Mittelwert Woche 35
2911	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	9,06	6,54	7,80	46,90	39,29	43,10	68,86	80,77	74,81	84,15	59,17	71,66
2912	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	6,77	6,01	6,39	11,72	12,66	12,19	27,27	41,21	34,24	33,48	25,26	29,37
3030	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	6,76	7,66	7,21	94,09	> 200	94,09	226,24	410,18	318,21	241,94	183,80	212,87
3032	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	6,36	6,25	6,31	37,80	381,85	209,83	102,58	166,46	134,52	114,38	62,02	88,20
3000	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	8,72	8,49	8,60	35,60	58,40	47,00	38,94	40,77	39,86	14,22	22,86	18,54
4007	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,15	0,43	0,29	34,44	22,75	28,60	19,55	10,38	14,96	30,31	11,90	21,11
4022	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	4,53	0,96	2,74	39,85	5,74	22,79	9,38	7,84	8,61	12,28	8,70	10,49
4034	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	1,50	1,06	1,28	21,70	14,55	18,12	30,60	18,42	24,51	39,29	13,74	26,52
4044	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	6,65	0,35	3,50	7,66	5,75	6,70	12,06	12,13	12,10	14,87	10,88	12,88
4090	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	2,76		2,76	15,19	6,06	0,00	25,09	7,34	16,21	9,75	5,52	7,63
4103	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	6,62	1,25	3,93	6,62	2,39	4,50	9,85	6,05	7,95	12,28	8,23	10,26
4110	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	5,02	0,51	2,77	34,90	13,16	24,03	45,41	32,00	38,71	41,58	30,40	35,99
4111	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	1,18	1,18	1,18	28,85	19,10	23,98	26,29	12,49	19,39	23,02	15,68	19,35
4117	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,39	0,44	0,41	35,36	19,88	27,62	19,87	12,74	16,31	24,59	11,98	18,28
4120	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	5,65	0,78	3,22	17,70	5,58	11,64	13,03	8,57	10,80	13,69	8,54	11,11
4123	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	4,07		4,07	3,55	2,59	3,07	37,57	20,25	28,91	40,27	20,33	30,30
4127	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	6,82	0,84	3,83	48,47	22,75	35,61	35,84	24,02	29,93	39,43	27,74	33,58
4135	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	3,12	1,76	2,44	27,49	35,42	31,46	19,29	8,08	13,69	18,23	7,75	12,99

Maus #	Virus	Titer	1. Messung Tag 0	2. Messung Tag 0	Mittelwert Tag 0	1. Messung Woche 8	2. Messung Woche 8	Mittelwert Woche 8	1. Messung Woche 27	2. Messung Woche 27	Mittelwert Woche 27	1. Messung Woche 35	2. Messung Woche 35	Mittelwert Woche 35
4146	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	2,38		2,38	1,20	1,39	1,29	0,81	1,32	1,06	2,58	1,08	1,83
4173	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,43	3,87	2,15	6,23	20,48	13,36	10,55	28,02	19,29	16,44	22,53	19,48
4185	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	1,37	4,20	2,79	9,06	14,75	11,91	10,94	36,97	23,95	15,13	29,62	22,37445
4197	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$			0,00	9,69	19,52	14,61	10,90	19,52	15,21	12,25	16,32	14,28845
4212	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,43	1,06	0,74	9,95	21,01	15,48	16,44	31,03	23,73	15,97	34,41	25,18735
4213	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,92	2,61	1,77	5,07	7,85	6,46	2,81		2,81	2,16	5,21	3,68045
4214	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,57	2,63	1,60	9,54	18,17	13,85	14,92	24,80	19,86	1,83	17,12	9,4739
Mittelwert					3,21			28,85			37,98			30,70
n					25			25			25			25
SD					2,38			42,50			64,33			42,64
SEM					0,48			8,50			12,87			8,53

2922	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	7,20	6,09	6,64	65,60	37,36	51,48	107,87	72,06	89,97	72,91	86,56	79,73
2939	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	7,04	7,50	7,27	93,80	28,69	61,24	28,03	214,82	121,43	6,85	14,72	10,79
3087	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	4,90	5,78	5,34	43,06	163,27	103,16	189,43	210,36	199,90	195,69	93,74	144,71
3088	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	8,11	5,17	6,64	27,23	39,28	33,25	22,70	27,37	25,03	21,73	23,72	22,72
3035	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	7,04	7,50	7,27	19,80	38,51	29,15	36,92	26,86	31,89	14,26	17,77	16,02
3005	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	8,57	4,72	6,65	30,67	50,62	40,65	120,82	88,34	104,58	92,74	92,34	92,54
3006	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	8,98	6,65	7,81	40,23	85,38	62,81	58,88	58,21	58,55	56,89	67,89	62,39
3026	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	8,66	5,25	6,96	43,27	292,96	168,11	108,32	89,19	98,76	59,66	49,98	54,82
3027	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	8,60	4,65	6,63	14,94	52,67	33,80	15,37	9,72	12,54	11,87	18,16	15,02
Mittelwert					6,80			64,85			82,52			55,42

Maus #	Virus	Titer	1. Messung Tag 0	2. Messung Tag 0	Mittelwert Tag 0	1. Messung Woche 8	2. Messung Woche 8	Mittelwert Woche 8	1. Messung Woche 27	2. Messung Woche 27	Mittelwert Woche 27	1. Messung Woche 35	2. Messung Woche 35	Mittelwert Woche 35
n					9			9			9			9
SD					0,68			44,93			58,56			45,05
SEM					0,23			14,98			19,52			15,02
2862	GFP	1*10 ¹⁰	6,56	5,76	6,16	3,96	5,34	4,65	10,77	11,42	11,10	11,34	11,39	11,36
2863	GFP	1*10 ¹⁰	7,18	6,83	7,00	3,05	3,89	3,47	9,16	7,65	8,41	7,12	6,41	6,76
2864	GFP	1*10 ¹⁰	5,36	8,42	6,89	3,41	2,47	2,94	9,50	9,24	9,37	9,12	8,98	9,05
2865	GFP	1*10 ¹⁰	6,74	6,33	6,54	4,85	4,89	4,87	11,53	10,05	10,79	10,35	9,53	9,94
2866	GFP	1*10 ¹⁰	6,49	6,16	6,32	5,51	5,73	5,62	10,21	8,20	9,21	9,87	8,97	9,42
2904	GFP	1*10 ¹⁰	6,91	6,46	6,69	6,39	5,18	5,79	10,49	5,45	7,97	10,65	6,71	8,68
2905	GFP	1*10 ¹⁰	6,44	5,94	6,19	7,50	6,32	6,91	10,29	7,95	9,12	8,52	4,50	6,51
2906	GFP	1*10 ¹⁰	6,23	6,42	6,33	4,98	5,52	5,25	9,77	12,86	11,31	5,98	5,99	5,98
2907	GFP	1*10 ¹⁰	5,53	6,06	5,79	4,31	5,08	4,70	9,77	11,42	10,59	9,83	9,74	9,78
2908	GFP	1*10 ¹⁰	7,18	7,25	7,22	3,97	6,00	4,98	9,30	7,65	8,48	8,20	9,35	8,77
2914	GFP	1*10 ¹⁰	7,05	7,36	7,21	5,08	5,36	5,22	8,02	9,24	8,63	9,60	8,84	9,22
2915	GFP	1*10 ¹⁰	6,87	7,24	7,05	4,49	6,65	5,57	10,46	10,05	10,25	9,32	10,46	9,89
2916	GFP	1*10 ¹⁰	6,41	7,59	7,00	3,22	6,27	4,74	8,73	8,20	8,47	8,72	8,46	8,59
2917	GFP	1*10 ¹⁰	6,88	9,30	8,09	4,28	5,29	4,79	9,68	5,45	7,57	7,51	6,48	7,00
2918	GFP	1*10 ¹⁰	7,27	6,10	6,68	10,42	5,23	7,82	9,21	7,95	8,58	9,56	7,48	8,52
2934	GFP	1*10 ¹⁰	9,33	7,23	8,28	9,20	4,17	6,68	8,81	5,72	7,26	5,98	5,99	5,98
2935	GFP	1*10 ¹⁰	10,47	8,66	9,56	11,91	5,76	8,83	7,74	7,19	7,46	9,83	9,74	9,78
2936	GFP	1*10 ¹⁰	8,71	8,95	8,83	11,43	6,72	9,08	7,96	7,49	7,72	8,20	9,35	8,77

Maus #	Virus	Titer	1. Messung Tag 0	2. Messung Tag 0	Mittelwert Tag 0	1. Messung Woche 8	2. Messung Woche 8	Mittelwert Woche 8	1. Messung Woche 27	2. Messung Woche 27	Mittelwert Woche 27	1. Messung Woche 35	2. Messung Woche 35	Mittelwert Woche 35
2937	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	9,35	10,29	9,82	10,08	5,36	7,72	6,19	7,21	6,70	9,60	8,84	9,22
2938	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	10,32	8,97	9,65	9,37	5,42	7,39	10,24	8,17	9,20	9,32	10,46	9,89
4018	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	3,03		3,03	0,99	1,31	1,15	1,31	3,41	2,36	3,14	8,20	5,67
4030	GFP	$1 \cdot 10^{10}$			0,00			0,00	1,07	1,65	1,36	1,26	1,89	1,57
4042	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	1,00	2,77	1,88	0,66	3,69	2,17	1,38	3,75	2,56	3,19	6,94	5,06
4054	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	1,02	2,60	1,81	1,45	1,96	1,71	0,68	1,86	1,27	3,03	5,78	4,40
4099	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,88	3,62	2,25			0,00	1,00	2,54	1,77	1,23	1,21	1,22
4109	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,39		0,39	0,75	5,86	3,31	0,80	3,65	2,22	3,31	6,97	5,14
4119	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	1,96	3,36	2,66	0,88	2,01	1,44	0,70	0,83	0,77	2,03	6,95	4,49
4129	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,81	4,14	2,48	0,79	3,97	2,38	1,24	3,67	2,46	1,11	2,82	1,96
4139	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	1,83	1,82	1,83	1,44	1,63	1,53	1,16	1,56	1,36	4,87	6,17	5,52
4149	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	1,40	2,14	1,77	0,90	2,46	1,68	0,79	1,72	1,25	3,00	2,95	2,97
4174	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	1,75	1,51	1,63	1,33	1,75	1,54	1,71	2,01	1,86	1,52	2,44	1,98
4186	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,16	2,54	1,35	0,59	0,85	0,72	1,03	1,70	1,37	3,00	3,01	3,00
Mittelwert					5,26			4,21			6,21			6,75
n					32			32			32			32
SD					2,97			2,58			3,70			2,92
SEM					0,53			0,46			0,65			0,52

2995	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	7,59	5,16	6,38	5,43	5,24	5,34	9,59	7,86	8,72	8,72	8,46	8,59
2996	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	5,05	4,52	4,79	5,36	5,03	5,20	8,35	6,77	7,56	7,51	6,48	7,00
2997	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	9,55	4,30	6,93	3,62	3,77	3,69	7,58	7,15	7,37	9,56	7,48	8,52

Maus #	Virus	Titer	1. Messung Tag 0	2. Messung Tag 0	Mittelwert Tag 0	1. Messung Woche 8	2. Messung Woche 8	Mittelwert Woche 8	1. Messung Woche 27	2. Messung Woche 27	Mittelwert Woche 27	1. Messung Woche 35	2. Messung Woche 35	Mittelwert Woche 35
2998	GFP	1*10 ¹¹	10,02	5,41	7,72	5,59	4,19	4,89	4,13	6,63	5,38	8,04	8,05	8,05
2999	GFP	1*10 ¹¹	10,56	6,60	8,58	7,07	6,23	6,65	8,73	7,31	8,02	11,17	15,47	13,32
3015	GFP	1*10 ¹¹	12,80	7,73	10,27	5,74	9,94	7,84	8,87	6,35	7,61	7,35	8,98	8,17
3016	GFP	1*10 ¹¹	22,06	7,27	14,66	7,83	11,03	9,43	9,27	7,15	8,21	8,80	10,77	9,79
3017	GFP	1*10 ¹¹	9,84	8,80	9,32	7,21	13,33	10,27	48,20	50,50	49,35	8,23	6,67	7,45
3018	GFP	1*10 ¹¹	6,13	7,37	6,75	6,34	12,98	9,66	9,21	6,42	7,81	7,34	7,96	7,65
3019	GFP	1*10 ¹¹	9,54	5,66	7,60	4,89	10,82	7,85	7,84	5,87	6,86	7,26	7,36	7,31
Mittelwert					8,30			7,08			11,69			8,58
n					10			10			10			10
SD					2,72			2,27			13,26			1,84
SEM					0,86			0,72			4,19			0,58

4223	nativ		1,52	2,13	1,82	1,33	2,29	1,81	0,43	2,04	1,24	9,92	1,52	5,72
4224	nativ		1,13	1,91	1,52	1,26	2,63	1,95	2,32	2,15	2,24	3,45	3,06	3,26
4225	nativ				0,00	1,40	1,56	1,48	1,42	1,90	1,66	2,47	3,03	2,75
4226	nativ				0,00	1,31	2,95	2,13	1,81	2,23	2,02	2,22	1,52	1,87
4227	nativ		0,62	1,52	1,07	1,57	2,62	2,10	1,99	1,73	1,86	3,21	2,31	2,76
4228	nativ		4,93		4,93	1,63	0,87	1,25	1,27	1,75	1,51	2,85	3,78	3,31
4229	nativ				0,00			0,00	1,40	1,91	1,65	4,55	3,05	3,80

Maus #	Virus	Titer	1. Messung Tag 0	2. Messung Tag 0	Mittelwert Tag 0	1. Messung Woche 8	2. Messung Woche 8	Mittelwert Woche 8	1. Messung Woche 27	2. Messung Woche 27	Mittelwert Woche 27	1. Messung Woche 35	2. Messung Woche 35	Mittelwert Woche 35
4231	nativ		0,90	0,91	0,90	1,40		1,40	0,73	2,24	1,48	5,53	4,81	5,17
4232	nativ		3,20	2,47	2,83	2,70	3,91	3,31	0,33		0,33	2,02	1,98	2,00
Mittelwert					1,45			1,71			1,55			3,40
n					9,00			9			9			9
SD					1,62			0,88			0,55			1,31
SEM					0,54			0,29			0,18			0,44

2. Ergebnisse der Thyroxinmessungen

Tabelle 4: Ergebnisse der T₄-Messungen (Angaben in mg/dl) mit Mittelwerten, SD und SEM

Maus #	Virus	Titer	1. Messung Woche 0	2. Messung Woche 0	3. Messung Woche 0	Mittelwert Woche 0	1. Messung Woche 8	2. Messung Woche 8	Mittelwert Woche 8	1. Messung Woche 23	2. Messung Woche 23	Mittelwert Woche 23	1. Messung Woche 27	2. Messung Woche 27	Mittelwert Woche 27	1. Messung Woche 35	2. Messung Woche 35	Mittelwert Woche 35
2911	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	4,29	5,00		4,65	12,65	12,67	12,66	12,46	12,78	12,62	13,84	14,67	14,25	9,20	8,17	8,69
2912	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	5,45	6,00		5,73	10,94	10,87	10,91	13,67	12,71	13,19	11,61	13,06	12,33	10,70	10,48	10,59
3030	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	8,74	7,79	6,43	8,27	11,14	10,47	10,81	13,26	13,13	13,20	13,19	12,32	12,75	11,83	9,77	10,80
3032	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	7,14	6,18	5,53	6,66	7,85	8,44	8,15	12,83	12,33	12,58	11,63	11,44	11,53	12,70	11,19	11,95
3000	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	4,10	5,17	3,71	4,64	7,12	6,89	7,01	5,07	5,66	5,36	5,88	6,04	5,96	3,23	3,19	3,21
4007	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	4,15	5,68		4,92	11,47	10,78	11,13	15,65	15,54	15,60	13,92	13,90	13,91	15,66	15,78	15,72
4022	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	5,91	6,48		6,19	10,38	11,19	10,79	8,04	8,33	8,18	6,77	6,93	6,85	6,35	6,64	6,50
4034	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	4,79	5,39		5,09	12,22	12,23	12,23	10,09	12,74	11,42	14,27	14,49	14,38	13,89	13,07	13,48
4044	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	6,67	7,88		7,28	10,68	11,45	11,06	7,63	7,79	7,71	6,03	7,36	6,69			
4090	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	5,80	7,54		6,67	10,52	10,61	10,56	9,93	11,72	10,83	8,94	9,24	9,09	7,05	7,46	7,25

Maus #	Virus	Titer	1. Messung Woche 0	2. Messung Woche 0	3. Messung Woche 0	Mittelwert Woche 0	1. Messung Woche 8	2. Messung Woche 8	Mittelwert Woche 8	1. Messung Woche 23	2. Messung Woche 23	Mittelwert Woche 23	1. Messung Woche 27	2. Messung Woche 27	Mittelwert Woche 27	1. Messung Woche 35	2. Messung Woche 35	Mittelwert Woche 35
4103	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	6,35	8,51		7,43	12,73	13,02	12,88	7,34	8,12	7,73	5,30	5,93	5,62	5,55	6,03	5,79
4110	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	5,28	6,84		6,06	14,27	11,91	13,09	14,82	14,18	14,50	15,37	15,55	15,46	14,95	14,64	14,80
4111	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	5,41	7,33		6,37	11,98	11,05	11,52	8,80	8,19	8,49	6,87	7,25	7,06	5,90	7,79	6,85
4117	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	4,72	5,66		5,19	9,87	10,16	10,01	12,40	12,16	12,28	11,73	11,18	11,46	9,14	9,07	9,10
4120	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	5,42	6,46		5,94	14,59	13,08	13,83	14,18	14,36	14,27	13,52	13,74	13,63	13,63	15,62	14,62
4123	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	5,38	7,42		6,40	10,80	9,53	10,16	13,06	14,18	13,62	11,31	11,60	11,45	10,52	10,77	10,65
4127	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	6,79	9,86		6,00	13,53	11,17	12,35	13,16	13,93	13,55	13,81	13,21	13,51	12,95	12,53	12,74
4135	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	4,58	5,42		5,00	10,10	9,19	9,64	8,03	7,99	8,01	6,66	6,17	6,42	5,63	6,29	5,96
4146	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	5,73	7,23		6,48	11,26	8,93	10,10	6,28	5,84	6,06	6,84	7,05	6,95	8,36	6,93	7,65
4173	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	5,37	5,88		5,62	14,45	11,76	13,11	9,98	14,79	9,37	10,30	9,99	10,15	9,43	9,99	9,71
4185	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	5,42	5,73		5,58	10,60	8,70	9,65	9,03	7,96	8,50	7,17	7,66	7,42	5,03	5,17	5,10
4197	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	6,41	7,38		6,89	10,51	9,35	9,93	7,55	7,92	7,73	6,98	7,93	7,46	5,19	6,74	5,97
4212	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	6,31	7,74		7,03	10,25	10,29	10,27	8,80	8,96	8,88	7,84	7,91	7,88	7,76	8,65	8,20
4213	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	5,61	6,81		6,21	8,70	8,24	8,47	3,01	2,53	2,77	4,83	4,48	4,66	3,81	4,52	4,16

Maus #	Virus	Titer	1. Messung Woche 0	2. Messung Woche 0	3. Messung Woche 0	Mittelwert Woche 0	1. Messung Woche 8	2. Messung Woche 8	Mittelwert Woche 8	1. Messung Woche 23	2. Messung Woche 23	Mittelwert Woche 23	1. Messung Woche 27	2. Messung Woche 27	Mittelwert Woche 27	1. Messung Woche 35	2. Messung Woche 35	Mittelwert Woche 35
4214	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	5,42	6,82		6,12	11,64	10,74	11,19	11,00	12,81	11,90	15,59	17,72	16,66	12,94	12,22	12,58
Mittelwert						6,10			10,86			10,33			10,14			9,25
n						25			25			25			25			24
SD						0,91			1,64			3,27			3,57			3,56
SEM						0,18			0,33			0,65			0,71			0,73

2922	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	5,81	6,38		6,10	8,52	9,84	9,18	10,35	11,91	11,13	5,74	4,46	5,10	4,43	5,45	4,94
2939	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	5,87	6,65		6,26	9,56	9,82	9,69	8,38	7,56	7,97	11,52	11,26	11,39	3,86	4,52	4,19
3087	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	5,04	5,52		5,28	7,28	6,09	6,69	9,27	8,25	8,76	4,36	5,48	4,92	3,06	3,61	3,34
3088	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	4,94	5,84		5,39	9,14	6,66	7,90	4,49	5,06	4,77	4,96	5,50	5,23	4,26	3,97	4,12
3035	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	5,46	6,14		5,80	8,63	6,53	7,58	6,62	6,84	6,73	4,27	4,23	4,25	4,37	4,82	4,60
3005	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	4,80	5,11		4,96	9,76	11,85	10,80				7,78	8,87	8,33	5,34	5,31	5,33
3006	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	4,41	5,05		4,73	9,69	9,64	9,67	3,81	4,20	4,01	5,43	6,21	5,82	4,89	4,67	4,78
3026	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	3,66	4,51	3,36	4,08	10,84	9,47	10,15	9,05	9,61	9,33	11,30	12,25	11,77	9,05	8,91	8,98
3027	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	4,07	4,78		4,43	9,31	7,68	8,49	5,45	5,95	5,70	7,63	8,35	7,99	5,40	5,46	5,43
Mittelwert						5,23			8,91			7,30			7,20			5,08
n						9			9			8			9			9
SD						0,75			1,34			2,43			2,84			1,60
SEM						0,25			0,45			0,86			0,95			0,53

Maus #	Virus	Titer	1. Messung Woche 0	2. Messung Woche 0	3. Messung Woche 0	Mittelwert Woche 0	1. Messung Woche 8	2. Messung Woche 8	Mittelwert Woche 8	1. Messung Woche 23	2. Messung Woche 23	Mittelwert Woche 23	1. Messung Woche 27	2. Messung Woche 27	Mittelwert Woche 27	1. Messung Woche 35	2. Messung Woche 35	Mittelwert Woche 35
2862	GFP	1*10 ¹⁰	5,38			5,38	5,62		5,62	4,96	5,01	4,98	6,83	6,98	6,91	3,78	3,51	3,65
2863	GFP	1*10 ¹⁰	5,35			5,35	5,06		5,06	4,06	4,29	4,17	5,81	6,49	6,15	6,83	6,56	6,70
2864	GFP	1*10 ¹⁰	6,69	5,22		6,69	5,81	5,79	5,80	4,73	4,66	4,70	6,50	5,70	6,10	5,42	5,45	5,43
2865	GFP	1*10 ¹⁰	4,88			4,88	5,26	5,72	5,49	4,87	5,17	5,02	5,87	6,13	6,00	4,43	4,51	4,47
2866	GFP	1*10 ¹⁰	4,67			4,67	4,86	5,20	5,03	4,82	4,94	4,88	5,25	5,31	5,28	4,58	4,86	4,72
2904	GFP	1*10 ¹⁰	4,34			4,34	4,18	5,65	4,92	3,54	3,92	3,73	5,96	3,83	4,90	4,62	4,83	4,73
2905	GFP	1*10 ¹⁰	4,89			4,89	5,13	7,24	6,19	3,71	3,97	3,84	7,33	5,28	6,31	4,43	4,66	4,55
2906	GFP	1*10 ¹⁰	5,30			5,30	5,79	4,39	5,09	5,33	5,42	5,38	4,65	6,59	5,62	3,99	4,24	4,12
2907	GFP	1*10 ¹⁰	4,81			4,81	3,48	6,56	5,02	3,80	3,74	3,77	5,75	1,04	3,39	3,82	3,62	3,72
2908	GFP	1*10 ¹⁰	4,93			4,93	4,61	4,94	4,78	3,63	3,84	3,73	6,33	5,26	5,80	4,03	3,95	3,99
2914	GFP	1*10 ¹⁰	5,72			5,72	5,58	6,25	5,92	4,33	4,76	4,54	6,37	6,45	6,41	4,17	4,40	4,28
2915	GFP	1*10 ¹⁰	4,99			4,99	5,62	6,20	5,91	5,85	5,78	5,82	0,85	6,08	3,47	4,86	4,54	4,70
2916	GFP	1*10 ¹⁰	5,90			5,90	5,72	6,59	6,15	8,06	7,29	7,68	7,32	6,46	6,89	4,60	4,30	4,45
2917	GFP	1*10 ¹⁰	22,87	3,86		3,86	4,83	5,05	4,94	5,32	5,17	5,24	6,80	7,04	6,92	2,54	3,31	2,93
2918	GFP	1*10 ¹⁰	5,32			5,32	5,82	6,03	5,93	4,55	5,26	4,90	6,12	5,28	5,70	4,13	4,28	4,21
2934	GFP	1*10 ¹⁰	5,70			5,70	3,56	3,81	3,68	4,51	4,57	4,54	6,57	5,62	6,10	4,30	4,17	4,23
2935	GFP	1*10 ¹⁰	6,04			6,04	4,21	4,82	4,51	5,21	5,52	5,37	5,22	5,83	5,52	3,30	2,88	3,09
2936	GFP	1*10 ¹⁰	6,37			6,37	4,89	5,97	5,43	3,71	4,15	3,93		4,88	4,88	4,25	3,93	4,09
2937	GFP	1*10 ¹⁰	5,66			5,66	4,91	5,84	5,37	3,86	4,32	4,09		6,65	6,65	3,93	3,30	3,62
2938	GFP	1*10 ¹⁰	6,17			6,17	4,60	5,40	5,00	4,23	4,42	4,32		5,54	5,54	3,94	3,84	3,89

Maus #	Virus	Titer	1. Messung Woche 0	2. Messung Woche 0	3. Messung Woche 0	Mittelwert Woche 0	1. Messung Woche 8	2. Messung Woche 8	Mittelwert Woche 8	1. Messung Woche 23	2. Messung Woche 23	Mittelwert Woche 23	1. Messung Woche 27	2. Messung Woche 27	Mittelwert Woche 27	1. Messung Woche 35	2. Messung Woche 35	Mittelwert Woche 35
4018	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	5,05	4,64		4,85	5,67	5,52	5,59	5,45	5,34	5,40	7,35	7,95	7,65	3,52	3,67	3,59
4030	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	7,51	8,25		7,88	4,96	3,96	4,46	6,32	6,84	6,58	6,87	6,47	6,67	4,49	4,32	4,41
4042	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	4,05	3,75		3,90	5,83	5,50	5,67	5,00	5,53	5,27	6,48	6,59	6,53	5,24	4,89	5,06
4054	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	3,75	3,72		3,73	4,78	4,39	4,58	3,89	4,20	4,04	5,40	5,46	5,43	4,11	4,29	4,20
4099	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	3,86	4,69		4,28	8,33	7,04	7,69	7,05	8,04	7,55	6,23	5,68	5,95	3,82	3,42	3,62
4109	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	5,77	4,75		5,26	5,58	4,91	5,24	7,15	8,04	7,59	7,29	5,67	6,48	4,22	4,15	4,19
4119	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	2,86	2,58		2,72	6,21	6,22	6,21	5,94	6,76	6,35	7,38	7,97	7,68	4,59	5,00	4,79
4129	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	7,44	8,11		7,77	7,73	6,97	7,35	6,42	6,13	6,28	6,17	6,34	6,25	4,90	4,08	4,49
4139	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	3,84	3,21		3,52	5,90	6,25	6,08	6,52	6,84	6,68						
4149	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	<1	<1			7,47	5,87	6,67	7,80	6,93	7,37	5,39	5,23	5,31	3,35	4,51	3,93
4174	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	5,25	4,24		4,74	7,67	6,09	6,88	6,67	7,68	7,17	7,65	8,59	8,12	9,62	5,32	6,08
4186	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	5,75	5,75		5,75	4,95	4,04	4,50	6,36	18,31	5,72	5,34	15,28	5,38	3,82	3,78	3,80
Mittelwert						5,20			5,52			5,33			6,00			4,31
n						31			32			32			31			31
SD						1,12			0,87			1,25			1,04			0,77
SEM						0,20			0,15			0,22			0,19			0,14

2995	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	5,91			5,91	4,53	5,54	5,03	5,00	5,19	5,10		5,84	5,84	4,54	4,34	4,44
2996	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	5,47			5,47	3,63	4,50	4,07	3,00	3,42	3,21		5,36	5,36	4,04	3,92	3,98
2997	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	6,75			6,75	4,18	5,68	4,93	5,28	5,14	5,21		6,07	6,07	3,94	3,66	3,80
2998	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	5,54			5,54	3,93	5,35	4,64	3,48	4,16	3,82		5,49	5,49	4,80	4,08	4,44
2999	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	6,05			6,05	4,58	5,32	4,95	4,56	4,84	4,70		6,19	6,19	5,32	4,40	4,86

Maus #	Virus	Titer	1. Messung Woche	2. Messung Woche	3. Messung Woche	Mittelwert Woche	1. Messung Woche	2. Messung Woche	Mittelwert Woche	1. Messung Woche	2. Messung Woche	Mittelwert Woche	1. Messung Woche	2. Messung Woche	Mittelwert Woche
3015	GFP	1*10 ¹¹	6,48			6,48	5,39	4,55	4,97	4,42	4,77	4,60		5,86	5,86
3016	GFP	1*10 ¹¹	5,74			5,74	4,13	3,46	3,80	3,99	4,47	4,23		6,41	6,41
3017	GFP	1*10 ¹¹	4,54			4,54	4,79	4,04	4,41	9,71	9,91	9,81		24,35	24,35
3018	GFP	1*10 ¹¹	5,66			5,66	4,93	4,37	4,65	4,30	4,10	4,20		4,97	4,97
3019	GFP	1*10 ¹¹	6,35			6,35	4,88	3,82	4,35	4,23	3,83	4,03		5,53	5,53
Mittelwert						5,85			4,58			4,89			7,61
n						10			10			10			10
SD						0,62			0,42			1,83			5,90
SEM						0,20			0,13			0,58			1,86

4223	nativ		3,46	4,35		3,91	5,96	5,59	5,77	5,99	6,22	6,11	5,97	5,39	5,68
4224	nativ		6,94	6,04		6,49	5,70	5,18	5,44	5,96	6,54	6,25	5,21	5,21	5,21
4225	nativ		6,40	6,31		6,35	6,92	7,33	7,12	8,34	8,21	8,27	7,36	8,79	8,07
4226	nativ		5,73	5,98		5,85	5,56	6,04	5,80	7,77	6,47	7,12	6,76	6,26	6,51
4227	nativ		5,04	5,64		5,34	7,43	7,29	7,36	8,42	7,87	8,14	7,12	7,56	7,34
4228	nativ		5,70	5,31		5,51	6,99	7,45	7,22	6,38	6,47	6,43	5,37	6,22	5,79
4229	nativ		5,39	5,62		5,50	6,25	6,66	6,46	6,43	6,06	6,24	5,31	4,74	5,02
4231	nativ		5,40	4,93		5,17	6,69	7,12	6,91	6,35	6,28	6,32	5,34	5,88	5,61
4232	nativ		5,30	5,37		5,33	5,50	5,17	5,33	5,89	6,22	6,06	6,68	7,71	7,19
Mittelwert						5,49			6,38			6,77			6,27
n						9			9			9			9
SD						0,75			0,81			0,87			1,06
SEM						0,25			0,27			0,29			0,35

4223	nativ		3,46	4,35		3,91	5,96	5,59	5,77	5,99	6,22	6,11	5,97	5,39	5,68
4224	nativ		6,94	6,04		6,49	5,70	5,18	5,44	5,96	6,54	6,25	5,21	5,21	5,21
4225	nativ		6,40	6,31		6,35	6,92	7,33	7,12	8,34	8,21	8,27	7,36	8,79	8,07
4226	nativ		5,73	5,98		5,85	5,56	6,04	5,80	7,77	6,47	7,12	6,76	6,26	6,51
4227	nativ		5,04	5,64		5,34	7,43	7,29	7,36	8,42	7,87	8,14	7,12	7,56	7,34
4228	nativ		5,70	5,31		5,51	6,99	7,45	7,22	6,38	6,47	6,43	5,37	6,22	5,79
4229	nativ		5,39	5,62		5,50	6,25	6,66	6,46	6,43	6,06	6,24	5,31	4,74	5,02
4231	nativ		5,40	4,93		5,17	6,69	7,12	6,91	6,35	6,28	6,32	5,34	5,88	5,61
4232	nativ		5,30	5,37		5,33	5,50	5,17	5,33	5,89	6,22	6,06	6,68	7,71	7,19
Mittelwert						5,49			6,38			6,77			6,27
n						9			9			9			9
SD						0,75			0,81			0,87			1,06
SEM						0,25			0,27			0,29			0,35

3. Histopathologische Ergebnisse

Tabelle 5: Schilddrüsengrößen (in mm³) mit Mittelwerten, SD und SEM

Maus #	Virus	Titer	Schilddrüsen- größe [mm ³]
2911	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	15,98
2912	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	13,62
3030	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	16,40
3032	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	19,20
3000	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	6,70
4007	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	14,83
4022	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	5,85
4034	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	13,75
4044	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	6,92
4090	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	7,95
4103	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	6,98
4110	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	17,37
4111	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	7,55
4117	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	8,29
4120	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	15,93
4123	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	15,26
4127	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	14,71
4135	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	6,99
4146	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	12,59
4173	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	10,78
4185	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	5,09
4197	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	6,50
4212	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	8,87
4213	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	4,27
4214	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	16,87
Mittel- wert			11,17
n			25
SD			4,61
SEM			0,92

2922	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	7,68
2939	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	14,30
3087	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	6,83
3088	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	8,44
3035	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	8,01
3005	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	8,47
3006	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	8,28

Maus #	Virus	Titer	Schilddrüsen- größe [mm ³]
3026	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	13,19
3027	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	9,46
Mittel- wert			9,41
n			9
SD			2,57
SEM			0,86

2862	GFP	1*10 ¹⁰	3,27
2863	GFP	1*10 ¹⁰	4,01
2864	GFP	1*10 ¹⁰	3,51
2865	GFP	1*10 ¹⁰	3,49
2866	GFP	1*10 ¹⁰	3,86
2904	GFP	1*10 ¹⁰	3,94
2905	GFP	1*10 ¹⁰	4,53
2906	GFP	1*10 ¹⁰	3,49
2907	GFP	1*10 ¹⁰	3,20
2908	GFP	1*10 ¹⁰	3,55
2914	GFP	1*10 ¹⁰	3,45
2915	GFP	1*10 ¹⁰	3,88
2916	GFP	1*10 ¹⁰	3,59
2917	GFP	1*10 ¹⁰	3,67
2918	GFP	1*10 ¹⁰	4,26
2934	GFP	1*10 ¹⁰	4,23
2935	GFP	1*10 ¹⁰	3,04
2936	GFP	1*10 ¹⁰	3,55
2937	GFP	1*10 ¹⁰	3,35
2938	GFP	1*10 ¹⁰	3,19
4018	GFP	1*10 ¹⁰	2,86
4030	GFP	1*10 ¹⁰	2,63
4042	GFP	1*10 ¹⁰	3,29
4054	GFP	1*10 ¹⁰	3,51
4099	GFP	1*10 ¹⁰	2,75
4109	GFP	1*10 ¹⁰	3,52
4119	GFP	1*10 ¹⁰	2,96
4129	GFP	1*10 ¹⁰	2,92
4139	GFP	1*10 ¹⁰	2,71
4149	GFP	1*10 ¹⁰	2,51
4174	GFP	1*10 ¹⁰	3,57
4186	GFP	1*10 ¹⁰	2,38
Mittel- wert			3,40
n			32
SD			0,52

Maus #	Virus	Titer	Schilddrüsen- größe [mm ³]
SEM			0,09

2995	GFP	1*10 ¹¹	3,41
2996	GFP	1*10 ¹¹	3,45
2997	GFP	1*10 ¹¹	3,31
2998	GFP	1*10 ¹¹	3,24
2999	GFP	1*10 ¹¹	3,96
3015	GFP	1*10 ¹¹	3,33
3016	GFP	1*10 ¹¹	3,83
3017	GFP	1*10 ¹¹	4,20
3018	GFP	1*10 ¹¹	3,60
3019	GFP	1*10 ¹¹	4,14
Mittel- wert			3,65
n			10
SD			0,36
SEM			0,11

4223	nativ		2,75
4224	nativ		2,43
4225	nativ		2,29
4226	nativ		2,60
4227	nativ		3,41
4228	nativ		2,68
4229	nativ		2,82
4231	nativ		2,26
4232	nativ		2,08
Mittel- wert			2,59
n			9
SD			0,39
SEM			0,13

Tabelle 6: Herzgewichte (in g) mit Mittelwerten. SD und SEM

Maus #	Herkunft Virus	Titer	Herz- gewicht [g]
2912	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,15
2911	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,17
3000	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,13
3032	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,15
3030	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,16
4007	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,13
4022	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,10
4034	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,15
4044	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,11
4090	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,13
4103	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,11
4110	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,14
4111	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,11
4117	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,13
4120	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,16
4123	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,15
4127	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,14
4135	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,13
4146	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,16
4173	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,11
4185	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,11
4197	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,12
4212	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,13
4213	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,10
4214	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	0,13
Mittel- wert			0,13
n			25
SD			0
SEM			0,00

2922	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	0,13
2939	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	0,16
3035	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	0,13
3087	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	0,12
3088	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	0,12
3005	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	0,14
3006	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	0,13
3026	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	0,16
3027	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	0,15
Mittel- wert			0,14

Maus #	Herkunft Virus	Titer	Herz- gewicht [g]
n			9
SD			0,02
SEM			0,01

2862	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,09
2863	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,12
2864	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,12
2865	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,12
2866	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,10
2904	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,13
2905	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,13
2906	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,12
2907	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,10
2908	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,12
2914	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,11
2915	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,14
2916	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,12
2917	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,12
2918	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,14
2934	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,11
2935	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,12
2936	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,14
2937	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,12
2938	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,12
4018	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,10
4030	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,09
4042	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,11
4054	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,10
4099	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,10
4109	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,11
4119	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,10
4129	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,09
4139	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,09
4149	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,09
4174	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,11
4186	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	0,10
Mittel- wert			0,11
n			32
SD			0,01
SEM			0,00

2995	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	0,11
------	-----	-------------------	------

Maus #	Herkunft Virus	Titer	Herz- gewicht [g]
2996	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	0,11
2997	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	0,13
2998	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	0,12
2999	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	0,11
3015	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	0,11
3016	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	0,12
3017	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	0,11
3018	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	0,12
3019	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	0,15
Mittel- wert			0,12
n			10
SD			0,01
SEM			0,00

4223	nativ		0,08
4224	nativ		0,09
4225	nativ		0,10
4226	nativ		0,09
4227	nativ		0,09
4228	nativ		0,10
4229	nativ		0,09
4231	nativ		0,09
4232	nativ		0,10
Mittel- wert			0,09
n			9
SD			0,01
SEM			0,00

4. Herzfrequenz

Tabelle 7: Ergebnisse der EKG-Messungen zu neun Messzeitpunkten mit Mittelwerten, SD und SEM (Angaben in bpm)

Woche			0	3	6	10	14	18	22	26	30	35
Tag			0	21	42	70	98	126	154	182	210	245
Maus #	Virus	Titer	1. Immuni- sierung	2. Immuni- sierung	3. Immuni- sierung	4. Immuni- sierung	5. Immuni- sierung	6. Immuni- sierung	7. Immuni- sierung	8. Immuni- sierung	9. Immuni- sierung	final
2911	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	390	450	480	630	610	610	560	470	625	670
2912	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	440	480	570	575	610	600	635	590	645	710
3030	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	465	455	595	465	600	635	580	520	610	715
3032	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	460	450	520	500	570	630	630	630	480	630
3000	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	380	410		455	320	480	400	420	515	475
4007	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	405	440	520	550	505	550	600	600	600	615
4022	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	450	420	490	650	520	560	540	550	410	565
4034	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	400	455	480	490	525	500	470	560	565	515
4044	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	380	390	410	435	420	460	405	485	455	475
4090	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	365	420	420	560	500	480	470	480	495	620
4103	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	315	410	510	470	470	550	480	405	455	450
4110	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	290	275	425	425	570	450	525	550	505	655
4111	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	390	365	460	510	515	440	375	540	460	580
4117	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	405	455	585	660	580	600	600	580	520	605
4120	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	350	360	410	490	580	660	670	655	520	590
4123	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	400	430	520	470	550	610	560	555	650	550

Woche			0	3	6	10	14	18	22	26	30	35
Tag			0	21	42	70	98	126	154	182	210	245
Maus #	Virus	Titer	1. Immuni- sierung	2. Immuni- sierung	3. Immuni- sierung	4. Immuni- sierung	5. Immuni- sierung	6. Immuni- sierung	7. Immuni- sierung	8. Immuni- sierung	9. Immuni- sierung	final
4127	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	425	385	475	470	460	530	560	520	500	520
4135	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	455	410	500	480	565	600	470	615	485	480
4146	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	310	395	420	620	570	600	620	430	525	475
4173	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	400	380	495	530	560	660	525	545	535	600
4185	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	360	365	325	355	470	435	445	400	530	465
4197	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	380	465	535	460	460	545	550	565	465	520
4212	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	415	375	445	585	605	640	665	575	660	620
4213	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	310	360	420	475	425	440	365	270	420	370
4214	Ad-TSHR	1*10 ¹⁰	325	460	550	585	485	635	610	575	640	162
Mittelwert			358	381	446	481	487	520	499	492	500	515
n			27	27	26	27	27	27	27	27	27	27
SD			113,68	115,35	139,04	146,89	142,43	149,03	147,74	141,30	133,23	159,03
SEM			21,88	22,20	27,27	28,27	27,41	28,68	28,43	27,19	25,64	30,61

2922	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	400	495	480	550	550	535	500	480	510	620
2939	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	410	370	415	575	520	520	525	585	620	600
3087	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	395	400	450	410	375	405	445	540	445	405
3088	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	390	430	410	490	470	600	555	600	535	480
3035	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	430	415	550	465	510	545	435	510	470	465
3005	Ad-TSHR	1*10 ¹¹	370	475		450	585	575	540	580	540	545

Woche			0	3	6	10	14	18	22	26	30	35
Tag			0	21	42	70	98	126	154	182	210	245
Maus #	Virus	Titer	1. Immunisierung	2. Immunisierung	3. Immunisierung	4. Immunisierung	5. Immunisierung	6. Immunisierung	7. Immunisierung	8. Immunisierung	9. Immunisierung	final
3006	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	370	425		450	515	530	550	570	540	345
3026	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	410	400	405	565	600	620	585	625	550	620
3027	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	450	450	470	500	530	580	535	550	480	575
Mittelwert			330	353	359	412	433	459	441	477	448	449
n			11	11	9	11	11	11	11	11	11	11
SD			164,60	172,29	195,15	191,60	196,68	201,03	182,42	192,04	173,56	182,58
SEM			49,63	51,95	65,05	57,77	59,30	60,61	55,00	57,90	52,33	55,05

2862	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	420	400	400	400	430	420	400	390	485	450
2863	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	470	390	470	445	475	435	450	440	490	420
2864	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	450	430	420	465	410	380	405	420	495	465
2865	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	420	400	440	450	440	445	415	415	510	440
2866	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	380	400	450	380	410	390	390	505	475	440
2904	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	390	390	390	420	380	400	430	430	440	345
2905	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	380	420	410	420	410	430	545	475	460	500
2906	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	360	420	430	420	435	440	525	455	490	505
2907	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	300	390	370	370	390	390	540	420	455	525
2908	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	430	485	430	400	440	430	505	430	495	515
2914	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	410	430	370	400	365	390	440	400	470	400
2915	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	400	400	375	350	430	390	460	455	500	460

Woche			0	3	6	10	14	18	22	26	30	35
Tag			0	21	42	70	98	126	154	182	210	245
Maus #	Virus	Titer	1. Immuni- sierung	2. Immuni- sierung	3. Immuni- sierung	4. Immuni- sierung	5. Immuni- sierung	6. Immuni- sierung	7. Immuni- sierung	8. Immuni- sierung	9. Immuni- sierung	final
2916	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	440	460	420	450	550	420	455	440	500	455
2917	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	400	430	420	485	410	390	420	470	485	400
2918	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	390	430	430	415	415	400	425	430	490	450
2934	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	410	470	410	510	470	440	545	505	535	470
2935	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	420	450	420	440	480	435	495	520	520	530
2936	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	380	400	400	435	435	475	450	540	530	530
2937	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	430	500	440	440	515	480	490	460	490	515
2938	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	390	425	380	460	400	435	475	480	490	430
4018	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	375	400	380	440	330	390	300	420	485	425
4030	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	470	560	390	535	420	390	330	430	385	410
4042	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	350	400	310	360	420	500	340	475	430	465
4054	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	380	330	445	390	300	420	400	310	430	465
4099	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	360	355	410	410	435	410	390	320	380	395
4109	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	395	450	400	380	465	405	390	375	440	375
4119	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	430	405	410	450	360	425	505	420	445	500
4129	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	345	400	450	380	360	380	355	400	365	415
4139	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	360	405	390	450	375	510	455	400	530	380
4149	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	430	450	450	430	470	475	445	435	420	465
4174	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	320	360	385	400	460	525	480	355	535	530

Woche			0	3	6	10	14	18	22	26	30	35
Tag			0	21	42	70	98	126	154	182	210	245
Maus #	Virus	Titer	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	final
4186	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	Immuni- sierung	Immuni- sierung	Immuni- sierung	Immuni- sierung	Immuni- sierung	Immuni- sierung	Immuni- sierung	Immuni- sierung	Immuni- sierung	455
Mittelwert			380	355	375	380	382	387	399	395	433	419
n			36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
SD			131,47	136,44	126,41	128,92	127,33	120,17	128,48	118,25	123,43	116,03
SEM			21,91	22,74	21,07	21,49	21,22	20,03	21,41	19,71	20,57	19,34

2995	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	350	435	440	400	345	465	425	500	470	445
2996	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	410	425	430	405	400	490	460	465	475	430
2997	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	410	460	460	410	435	550	460	415	430	440
2998	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	410	465	470	420	420	490	540	545	490	545
2999	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	385	470	430	380	430	510	475	520	490	460
3015	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	390	410	390	380	385	420	515	425	435	505
3016	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	380	450	450	440	420	450	485	510	520	460
3017	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	430	440	410	335	410	640	655	635	640	485
3018	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	340	410	350	418	400	430	415	470	450	300
3019	GFP	$1 \cdot 10^{11}$	450	475	460	450	420	450	495	540	480	390
Mittelwert			396	444	429	404	407	490	493	503	488	446
n			10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
SD			33,87	23,90	36,95	33,05	26,36	65,68	68,49	64,34	59,92	66,62
SEM			10,71	7,56	11,69	10,45	8,33	20,77	21,66	20,35	18,95	21,07

Woche			0	3	6	10	14	18	22	26	30	35
Tag			0	21	42	70	98	126	154	182	210	245
Maus #	Virus	Titer	1. Immuni- sierung	2. Immuni- sierung	3. Immuni- sierung	4. Immuni- sierung	5. Immuni- sierung	6. Immuni- sierung	7. Immuni- sierung	8. Immuni- sierung	9. Immuni- sierung	final
4223	nativ		390	390	430	450	380	345	480	450	505	525
4224	nativ		365	320	450	415	340	320	430	450	460	460
4225	nativ		535	390	310	420	360	410	455	500	550	505
4226	nativ		390	380	300	350	350	410	390	425	460	425
4227	nativ		330	375	320	345	295	370	340	370	500	445
4228	nativ		480	320	400	390	370	330	415	345	520	355
4229	nativ		490	425	380	455	365	345	435	350	475	430
4231	nativ		525	475	445	440	380	330	465	420	500	420
4232	nativ		455	405	410	420	360	390	425	390	430	400
Mittelwert			440	387	383	409	356	361	428	411	489	441
n			9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
SD			73,57	48,35	58,90	40,27	26,15	35,07	42,87	51,77	36,30	51,75
SEM			24,52	16,12	19,63	13,42	8,72	11,69	14,29	17,26	12,10	17,25

5. Körpergewicht

Tabelle 8: Entwicklung des Körpergewichts (in g) mit Mittelwerten, SD und SEM

Woche			0	3	6	10	14	18	22	26	30	35
Tag			0	21	42	70	98	126	154	182	210	245
Maus #	Virus	Titer	1. Immunisierung	2. Immunisierung	3. Immunisierung	4. Immunisierung	5. Immunisierung	6. Immunisierung	7. Immunisierung	8. Immunisierung	9. Immunisierung	final
2911	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	16	19	22	22	22	24	24	25	25	26
2912	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	16	20	21	23	23	25	25	26	26	27
3030	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	18	20	20	24	24	25	26	25	26	26
3032	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	17	20	21	23	23	25	25	25	26	26
3000	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	17	20	22	22	22	23	23	24	25	25
4007	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	18	19	20	21	21	22	22	24	25	25
4022	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	17	18	20	22	22	23	23	24	23	24
4034	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	18	19	21	22	24	24	24	24	24	24
4044	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	17	18	18	20	21	22	22	22	23	23
4090	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	16	18	20	21	23	24	25	23	25	26
4103	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	16	18	21	22	23	24	24	23	25	25
4110	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	17	18	21	23	24	24	25	24	24	25
4111	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	16	19	20	22	23	24	23	24	25	25
4117	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	18	19	21	22	23	24	24	24	25	26
4120	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	17	18	20	22	23	24	24	24	24	25

Woche			0	3	6	10	14	18	22	26	30	35
Tag			0	21	42	70	98	126	154	182	210	245
Maus #	Virus	Titer	1. Immuni- sierung	2. Immuni- sierung	3. Immuni- sierung	4. Immuni- sierung	5. Immuni- sierung	6. Immuni- sierung	7. Immuni- sierung	8. Immuni- sierung	9. Immuni- sierung	final
4123	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	18	19	21	22	23	23	24	25	26	27
4127	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	17	18	20	21	22	22	23	25	25	23
4135	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	18	20	21	22	23	24	24	25	26	25
4146	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	18	20	21	24	26	26	26	27	28	29
4173	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	17	16	20	21	21	20	21	22	22	22
4185	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	16	18	20	19	21	21	21	23	23	22
4197	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	18	19	21	23	23	24	25	25	25	25
4212	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	18	19	20	22	23	23	23	24	24	25
4213	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	19	20	20	21	21	23	23	23	22	24
4214	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{10}$	18	19	20	21	22	22	23	23	24	24
Mittelwert			16,0	18,3	20,7	23,2	25,1	27,0	28,4	30,0	31,7	33,5
n			27	27	27	27	27	27	27	27	27	27
SD			4,68	3,23	5,14	9,68	14,71	19,86	25,13	30,39	35,67	42,34
SEM			0,90	0,62	0,99	1,86	2,83	3,82	4,84	5,85	6,87	8,15

2922	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	17	20	21	22	22	24	24	25	24	27
2939	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	19	21	21	22	22	26	25	25	26	26
3087	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	17	18	21	20	21	21	23	22	23	23
3088	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	18	20	22	23	23	24	24	24	24	25
3035	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	17	20	21	22	22	23	24	23	24	24
3005	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	17	18	20	21	22	24	25	25	25	25

Woche		0	3	6	10	14	18	22	26	30	35
Tag		0	21	42	70	98	126	154	182	210	245
Maus #	Virus	Titer	Immuni- sierung	Immuni- sierung	Immuni- sierung	Immuni- sierung	Immuni- sierung	Immuni- sierung	Immuni- sierung	Immuni- sierung	final
3006	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	18	19	21	23	24	25	25	27	27
3026	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	18	18	22	22	23	24	25	25	26
3027	Ad-TSHR	$1 \cdot 10^{11}$	17	19	20	22	24	25	25	26	25
Mittelwert			14,4	17,9	21,4	24,9	32,5	35,9	38,8	42,2	46,2
n			11	11	11	11	11	11	11	11	11
SD			7,13	5,07	8,18	15,37	31,09	39,18	47,50	55,69	66,01
SEM			2,15	1,53	2,47	4,63	9,38	11,81	14,32	16,79	19,90

2862	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	16	19	19	22	20	22	22	22	22
2863	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	16	20	22	22	20	23	23	25	25
2864	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	16	20	21	21	20	22	24	24	24
2865	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	17	19	20	21	20	23	22	23	24
2866	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	16	19	21	22	21	22	23	23	24
2904	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	15	20	21	22	22	23	23	25	25
2905	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	16	20	21	23	22	26	26	28	30
2906	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	16	19	21	22	22	22	23	25	25
2907	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	16	19	20	22	22	22	23	23	25
2908	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	16	19	20	21	22	21	23	23	24
2914	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	17	18	18	21	22	22	23	20	22
2915	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	16	20	21	23	23	23	25	24	26
2916	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	15	20	20	22	22	24	24	23	25

Woche			0	3	6	10	14	18	22	26	30	35
Tag			0	21	42	70	98	126	154	182	210	245
Maus #	Virus	Titer	1. Immuni- sierung	2. Immuni- sierung	3. Immuni- sierung	4. Immuni- sierung	5. Immuni- sierung	6. Immuni- sierung	7. Immuni- sierung	8. Immuni- sierung	9. Immuni- sierung	final
2917	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	16	18	20	22	22	22	25	24	23	25
2918	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	17	18	21	22	22	23	25	24	24	24
2934	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	17	19	20	21	22	22	24	24	24	25
2935	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	17	19	20	21	22	23	25	23	23	25
2936	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	17	19	20	21	22	22	24	26	26	26
2937	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	18	20	21	20	22	22	23	23	23	24
2938	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	18	20	20	21	22	22	24	23	24	25
4018	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	17	19	20	22	22	22	22	23	25	25
4030	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	17	18	20	21	21	21	22	23	24	24
4042	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	18	21	23	22	23	25	25	26	26	27
4054	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	17	19	20	21	21	23	23	22	25	25
4099	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	16	19	21	21	22	24	24	23	24	26
4109	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	16	20	20	21	23	23	23	23	24	24
4119	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	16	18	20	20	21	23	22	23	24	25
4129	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	17	19	21	21	22	22	23	24	24	25
4139	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	18	19	21	21	22	23	23	24	24	24
4149	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	16	17	20	19	20	21	21	23	25	23
4174	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	17	16	20	20	21	21	22	23	24	25
4186	GFP	$1 \cdot 10^{10}$	17	18	20	20	21	21	22	24	24	24
Mittelwert			15,6	18,6	20,6	22,4	23,6	25,4	26,9	28,2	29,6	31,5

Woche			0	3	6	10	14	18	22	26	30	35
Tag			0	21	42	70	98	126	154	182	210	245
Maus #	Virus	Titer	1. Immuni- sierung	2. Immuni- sierung	3. Immuni- sierung	4. Immuni- sierung	5. Immuni- sierung	6. Immuni- sierung	7. Immuni- sierung	8. Immuni- sierung	9. Immuni- sierung	final
n			34	34	34	34	34	34	34	34	34	34
SD			4,03	2,95	4,59	8,68	13,23	17,82	22,49	27,19	31,91	37,79
SEM			0,69	0,51	0,79	1,49	2,27	3,06	3,86	4,66	5,47	6,48

2995	GFP	1*10 ¹¹	17	18	20	21	22	21	22	23	22	24
2996	GFP	1*10 ¹¹	18	20	20	21	22	23	24	24	25	25
2997	GFP	1*10 ¹¹	19	20	20	21	22	23	25	24	25	25
2998	GFP	1*10 ¹¹	19	19	21	21	22	22	24	24	25	25
2999	GFP	1*10 ¹¹	17	19	20	22	22	22	25	23	24	25
3015	GFP	1*10 ¹¹	18	18	20	21	22	22	23	23	23	23
3016	GFP	1*10 ¹¹	18	19	21	21	22	23	23	23	24	24
3017	GFP	1*10 ¹¹	19	19	21	22	22	22	23	23	24	23
3018	GFP	1*10 ¹¹	18	19	20	22	22	23	22	22	24	25
3019	GFP	1*10 ¹¹	17	19	22	22	22	24	25	25	26	26
Mittelwert			18,0	19,0	20,5	21,4	22,0	22,5	23,6	23,4	24,2	24,5
n			10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
SD			0,82	0,67	0,71	0,52	0,00	0,85	1,17	0,84	1,14	0,97
SEM			0,26	0,21	0,22	0,16	0,00	0,27	0,37	0,27	0,36	0,31

4223	nativ		18	19	20	20	20	21	21	22	22	22
4224	nativ		17	18	20	20	20	21	20	22	22	22

Woche			0	3	6	10	14	18	22	26	30	35
Tag			0	21	42	70	98	126	154	182	210	245
Maus #	Virus	Titer	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	final
4225	nativ		17	19	20	20	21	21	22	22	23	24
4226	nativ		17	18	20	20	20	21	20	22	22	23
4227	nativ		17	18	20	22	20	22	22	23	24	24
4228	nativ		17	18	20	20	20	22	20	23	23	23
4229	nativ		18	18	20	20	19	20	21	22	23	23
4231	nativ		17	18	20	20	20	21	21	21	22	23
4232	nativ		16	17	19	20	19	21	20	22	22	22
Mittelwert			14,0	17,0	20,6	23,8	26,5	30,4	33,0	37,0	40,3	44,2
n			11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
SD			6,94	4,75	8,23	15,63	23,80	31,74	40,14	48,11	56,34	66,71
SEM			2,09	1,43	2,48	4,71	7,18	9,57	12,10	14,51	16,99	20,11

6. Score Sheet

Tabelle 9: Score Sheet zur Beurteilung der Tiergesundheit

[illegible]

AB = Allgemeinbefinden Hf = Herzfrequenz

Ab einer Score-Summe von **16 Punkten** wird das Tier unverzüglich euthanasiert.

Wird das höchste Score bei einem Bewertungskriterium erreicht, so wird das Tier ebenfalls unverzüglich euthanasiert.

Scoring Details:

	0	1	2	3
Gewicht	0 - 4%	5 - 10%	11 - 19%	≥ 20%
Allgemeinbefinden	munter	reduziert	isoliert	apathisch
Körperhaltung	unauffällig	auffällig, leicht gekrümmter Rücken	stark gekrümmter Rücken	
Abdomen/ Gliedmaßen	unauffällig	Bauch leicht aufgezo-gen Gliedmaßen leicht geschwollen	Bauch prall, Leber palpierbar Gliedmaßen stark geschwollen/ödematös	
Atmung	unauffällig	schnell / verlangsamt	flach / pumpend	
Herzfrequenz	innerhalb range (0-20%)	Erhöhung 21-39%	Erhöhung 40-59%	Erhöhung ≥60%
Pflegezustand / Kotbeschaffenheit	gepflegt	reduzierte Fellpflege Augensekret	struppiges Fell Kot ungeformt	Kotverschmutzung starker Durchfall verklebte Augen
Hautzustand/ Fell/Schwanz	unauffällig	schuppig, trocken vereinzelt haarlose Stellen Schwanz leicht entzündet, rot	Hautveränderungen starker Juckreiz große kahle Stellen Schwanz stark entzündet, keine BE möglich	
Augen	unauffällig	Tränen der Augen	leichter Exophthalmus	starker Exophthalmus kein Lidschluß möglich Corneulceration
Injektionsstelle Oberschenkel	keine sichtbaren Veränderungen	Schwellung < 24h	Entzündungszeichen, beginnende Abszesse	nicht therapierbare Abszesse und Tumore

X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Ergebnisse des ELISA der 2. Generation mit Mittelwerten, SD und SEM	75
Tabelle 2: Ergebnisse des ELISAs der 3. Generation (Angaben in U/l) mit Mittelwerten, SD und SEM.....	77
Tabelle 3: Ergebnisse der cAMP-Messungen (Angaben in pmol/ml) mit Mittelwerten, SD und SEM.....	83
Tabelle 4: Ergebnisse der T ₄ -Messungen (Angaben in mg/dl) mit Mittelwerten, SD und SEM	89
Tabelle 5: Schilddrüsengrößen (in mm ³) mit Mittelwerten, SD und SEM.....	95
Tabelle 6: Herzgewichte (in g) mit Mittelwerten. SD und SEM	98
Tabelle 7: Ergebnisse der EKG-Messungen zu neun Messzeitpunkten mit Mittelwerten, SD und SEM (Angaben in bpm)	101
Tabelle 8: Entwicklung des Körpergewichts (in g) mit Mittelwerten, SD und SEM	107
Tabelle 9: Score Sheet zur Beurteilung der Tiergesundheit.....	113

XI. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: molekulare Struktur des TSH-Rezeptors nach Rapoport und McLachlan.....	5
Abbildung 2: Bindungsstellen der A-Domäne nach Nunez Miguel	6
Abbildung 3: Situs der Schilddrüse	17
Abbildung 4: Histologisches Bild der Schilddrüse der Maus	18
Abbildung 5: Versuchsaufbau.....	23
Abbildung 6: Verlauf der Herzfrequenz über vier Minuten.....	24
Abbildung 7: Verlauf des Antikörpertiters im 3rd Generation Assay	30
Abbildung 8: TSH-Inhibition im 2nd Generation Assay.	31
Abbildung 9: Verlauf der cAMP Aktivität in CHO-Testzellen zu fünf Messzeitpunkten.....	32
Abbildung 10: Verlauf der T ₄ Konzentration im Serum.....	34
Abbildung 11: Verlauf der Herzfrequenz	35
Abbildung 12: Steigerung der Herzfrequenz im Verlauf der Studie.....	36
Abbildung 13: Effekt der Immunisierungen im histologischen Bild	37
Abbildung 14: Vergleich der Schilddrüsengröße nach neun Immunisierungen ...	38
Abbildung 15: Schilddrüsenvolumen nach neun Immunisierungen	39
Abbildung 16: Histologie des Herzens	40
Abbildung 17: Vergleich des Herzgewichts nach neun Immunisierungen.....	41
Abbildung 18: Gewichtsverlauf über 35 Wochen.....	42

XII. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Hrn. PD Dr. Sven Reese für die Betreuung dieser externen Arbeit und die exzellente Unterstützung und zügige Korrektur bedanken.

Mein Dank gilt zudem Hrn. Prof. Dr. Martin Ungerer, der mir ermöglicht hat diese Arbeit in der advanceCOR GmbH anzufertigen und den Fortschritt der Arbeit stets voran getrieben hat!

Danke auch allen Mitarbeitern der advanceCOR GmbH, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Mein Dank gilt insbesondere Hans-Peter und Zhongmin, die zu allen möglichen und unmöglichen Zeiten ein offenes Ohr für meine Fragen hatten! Außerdem danke ich Stephan, Mark und Jürgen. Isabel danke ich für das Versorgen der Mäuse und Uli für schöne Mittagspausen! Meinem Kollegen Andreas möchte ich an dieser Stelle besonders danken für unermüdliche Motivation, zuverlässige Urlaubsvertretungen und Hilfestellung bei zahllosen Computerproblemen.

Meiner Kollegin Silvi danke ich ganz herzlich für die Idee zu dieser Arbeit und ihren Einsatz bei der Umsetzung.

Bei meinen Freunden, insbesondere bei Teresa und Gaby, möchte ich mich für die Unterstützung und Motivation, sowie für regelmäßige Ablenkung bedanken.

Ein riesengroßes Dankeschön an meine Eltern, ohne deren finanzielle und moralische Unterstützung dieser Werdegang nicht möglich gewesen wäre! Danke, dass ihr mich immer unterstützt habt! Und an meine Oma Maria, die immer an diesen Werdegang geglaubt hat, auch wenn sie ihn leider nicht mehr miterleben durfte.

Außerdem bedanke ich mich bei meinem Schwiegervater Norbert Pütz für die kritische Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit und bei meiner Schwiegermutter Gaby fürs Daumen drücken.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Mann Chris, der mich durch alle Höhen und Tiefen des Studiums und der Dissertation begleitet hat. Danke für deine Geduld und dein Verständnis und dafür, dass du immer an mich geglaubt hast!